

Beiträge zur Analytik der Mutterkornalkaloide

Papierchromatographische Studien zur Erfassung
der pharmakologischen Wertminderung
von Ergometrin und Ergotamin in verschiedenen
Lösungsmitteln und in Tabletten.

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Johannes Gutenberg-Universität
zu Mainz

Walter Merz

Mainz 1955

BEITRÄGE ZUR ANALYTIK DER MUTTERKORNALKALOIDE:

Papierchromatographische Studien zur Erfassung der
pharmakologischen Wertminderung von Ergometrin und
Ergotamin in verschiedenen Lösungsmitteln und in Tabletten.

D i s s e r t a t i o n

z u r E r l a n g u n g d e s D o k t o r g r a d e s

bei der Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Johannes Gutenberg-Universität

zu Mainz

eingereicht von

W a l t e r M e r z

gehören in Stuttgart

Mainz 1955

Dekan: Prof.Dr.H.Rohrbach

1. Berichterstatter: Prof.Dr.H.Rochelmeyer

2. Berichterstatter: Prof.Dr.G.Kuschinsky

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Februar 1955

Meinen lieben Eltern !

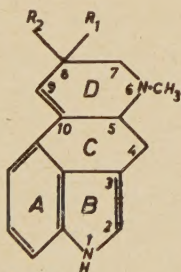
Es sei mir an dieser Stelle gestattet, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. H. Rochelmeyer sowohl für die Überlassung der Arbeit als auch für die Betreuung und wertvollen Ratschläge bei der Ausführung derselben meinen tiefempfundenen Dank auszusprechen.

Ferner danke ich der Firma Excorna, Mainz für die Überlassung von Reinalkaloiden und von "Secale concentratum STADA".

Die Arbeit wurde durch Bereitstellung von ERP-Mitteln ermöglicht.

Das Mutterkorn verdankt seine physiologische Wirkung der Anwesenheit einer Anzahl von Alkaloiden. Nach jahrzehntelangen Forschungsarbeiten in den U.S.A., England und der Schweiz, an welchen G. Barger, S. Smith und G.M. Timmis, sowie W.A. Jacobs und L.C. Craig maßgebend beteiligt waren, gelang es 1951 A. Stoll und seinen Mitarbeitern (1), die kompliziert aufgebauten Mutterkornalkaloide in ihrer Struktur restlos aufzuklären.

Ihr chemischer Grundkörper ist das Ergolen, von dessen Methylhomologen, dem 6-Methylergolen (Formelbild 1), sich alle bis heute aufgefundenen Mutterkornalkaloide ableiten lassen.



$R_1=R_2=H$: Δ^9 -6-Methylergolen

$R_1=CH_3$; $R_2=H$: Δ^8 -6,8-Dimethylergolen (Agroclavin)

$R_1=CH_2OH$; $R_2=H$: Δ^8 -6-Methyl-8-Oxymethylergolen (Elymoclavin)

$R_1=CH_2OH$; $R_2=OH$: Δ^9 -6-Methyl-8-Oxymethylergolen-ol-(8) (Peniclavin)

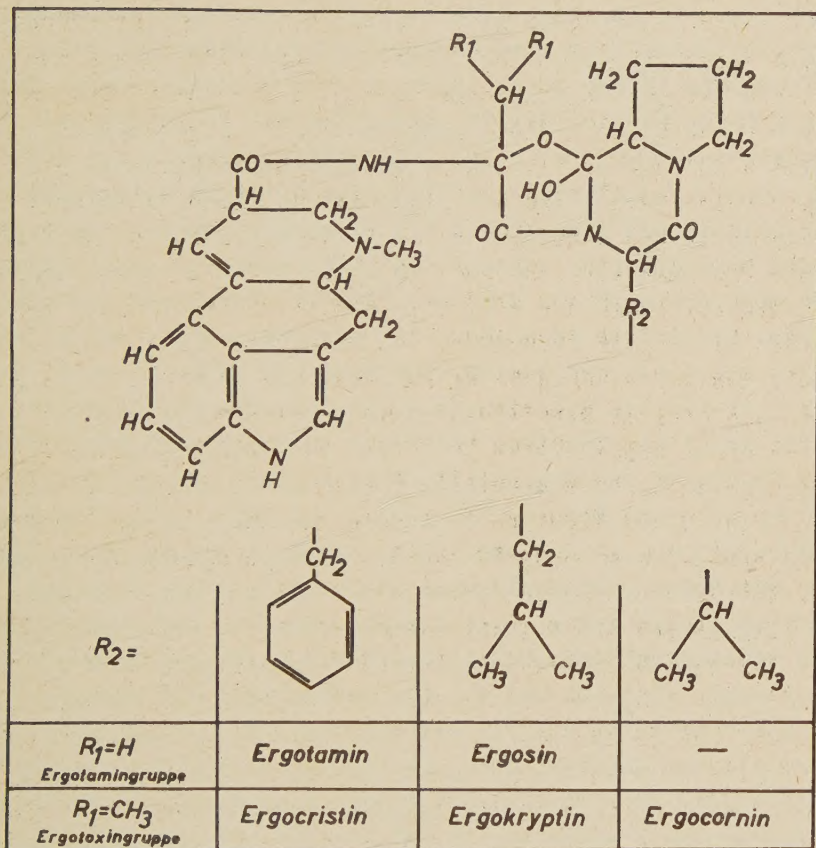
$R_1=COOH$; $R_2=H$: Δ^9 -6-Methyl-8-carboxylergolen (Lysergsäure)

Formelbild 1

Ersetzt man in ihm am Kohlenstoffatom 8 ein Wasserstoffatom durch eine Methylgruppe, so erhält man das 6,8-Dimethylergolen, welches von Abe und seinen Mitarbeitern (2) in

japanischem Mutterkorn aufgefunden wurde. Dieses Alkaloid wurde von dem japanischen Forscher Agroclavin genannt. Als eine oxydierte Variante des Agroclavin kann das Elymoclavin (3) angesehen werden, welches ebenfalls von dem japanischen Arbeitskreis entdeckt wurde. Ein Dioxagroclavin ist das Peniclavine, welches von A. Stoll und seinen Mitarbeitern (4) aus afrikanischem Grasmutterkorn isoliert wurde. In dieser Agroclavinreihe kann die Lysergsäure als Endstufe der Oxydation der Methylgruppe am Kohlenstoffatom 8 angesehen werden. Zur Neutralisierung wird dieses 6-Methyl-8-carboxyergolen mit Aminosäurekomplexen verschlossen, und liefert uns so der Pilz die klassischen Mutterkornalkaloide der Lysergsäurereihe.

Das Grundskelett dieser therapeutisch ungleich wichtigeren Mutterkornalkaloide bildet also die Lysergsäure (Formelbild 1). Sie ist charakterisiert durch das Indolsystem der Ringe A und B, in welchem besonders das H-Atom der Iminogruppe und das in α -Stellung befindliche Wasserstoffatom reaktionsfähig sind. Außerdem läßt sich in der Formel noch ein Naphthalinsystem (Ring A und C), sowie ein partiell hydriertes Chinolinsystem in den Ringen C und D erkennen. Auch die Gruppierung von Nikotinsäure kann am Ring D gesehen werden. Der Stickstoff des Ringes D ist durch eine Methylgruppe substituiert und ist für die Salzbildung mit anorganischen und organischen Säuren verantwortlich. Die Carboxylgruppe am asymmetrischen Kohlenstoffatom 8 zeigt starke Enolisierungstendenz; dies ist die Voraussetzung für die charakteristische Umlagerung der linksdrehenden Mutterkornalkaloide in ihre rechtsdrehenden Isomeren. Von besonderer Bedeutung ist der ungesättigte Charakter der Lysergsäure. Er besteht in einem konjugierten System von 5 Doppelbindungen, wovon die Doppelbindung in der Stellung 9-10 leicht hydrierbar ist. Damit stellt die Lysergsäure ein recht empfindliches Molekül dar, was in der Unbeständigkeit der Mutterkornalkaloide zum Ausdruck kommt.

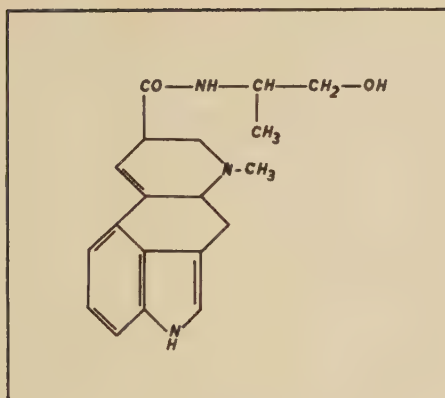


Formelbild 2

Im Formelbild 2 ist die Möglichkeit gegeben, durch Variation von R₁ und R₂ die Konstitutionsformeln für jedes Alkaloid vom Polypeptidtypus aufzuzeichnen. In diesen Basen, den sog. "wasserunlöslichen" Alkaloiden ist die Lysergsäure mit einem Polypeptidkomplex verknüpft, wobei sich die Carboxylgruppe der Lysergsäure mit einer Aminogruppe des Peptidteiles säureamidartig verbindet. Die Peptidkomponente ist aus drei verschiedenen Aminosäuren aufgebaut, von denen

eine immer Prolin ist. Eine zweite, welche die Verbindung zum Lysergsäuresystem herstellt, unterscheidet als Kennzeichen die beiden Alkaloidgruppen der Ergotamin- bzw. Ergotoxinreihe. Es sind dies α -Oxyalanin für Ergotamin und Ergosin und α -Oxyvalin für Ergocristin, Ergokryptin und Ergocornin. Damit sind die Alkaloide der Ergotoxingruppe Ergocristin und Ergokryptin die Dimethylhomologen von Ergotamin bzw. Ergosin, während ein entsprechendes Alkaloid für das Ergocornin in der Ergotaminreihe bisher nicht gefunden wurde. Die dritte Aminosäure ist innerhalb einer Gruppe variabel, was durch den Rest R_2 zum Ausdruck gebracht wird, welcher als zweiter Substituent am α -C-Atom einer α -Aminosäure deren Konstitution bestimmt. So ergibt der Benzylrest bei Ergotamin und Ergocristin Phenylalanin, der Isobutylrest bei Ergosin und Ergokryptin Leucin und der Isopropylrest bei Ergocornin die Aminosäure Valin. Die Verknüpfung der einzelnen Aminosäuren untereinander geschieht so, daß sich die Carboxylgruppe der α -Oxy- α -Aminosäure mit der Aminogruppe der "variablen" Aminosäure peptidartig verbindet. Deren Carboxylgruppe wiederum ist mit der Aminogruppe des Prolins in gleicher Weise verknüpft, während die Carboxylgruppe des Prolins mit der Oxygruppe der α -Oxy- α -Aminosäure einen neungliedrigen Lactonring bildet. Durch eine Wasserstoffverschiebung von dem Stickstoffatom der "variablen" Aminosäure zu der Carbonylgruppe des Lactonsystems entsteht eine Hydroxylgruppe mit beweglichem Wasserstoff und gleichzeitig wird das Ringsystem in einen sechsgliedrigen und in einen fünfgliedrigen Ring unterteilt. Die Cycloltheorie von D.M. Wrinch (5), welche derartige Wasserstoffübertragungen von einer NH- auf eine CO-Gruppe in Peptidsystemen als charakteristisch ansieht, hat damit eine wesentliche Stütze erfahren.

In dem wasserlöslichen Alkaloid Ergometrin (6) ist die Carboxylgruppe der Lysergsäure mit der freien Aminogruppe des α -Aminopropanols ebenfalls säureamidartig verbunden (Formelbild 3).



Formelbild 3

Als genuine Mutterkornalkaloide werden nur die Abkömmlinge der Lysergsäure angesehen. Ihre rechtsdrehenden Isomeren dagegen, welche sich von der Isolysergsäure ableiten, können demzufolge als "Kunstprodukte", entstanden bei der Aufarbeitung der Droge bezeichnet werden. Des weiteren unterscheiden sich die Alkaloide der Lysergsäurereihe von denen der Isolysergsäure durch ihre pharmakologische Wirksamkeit. Bekanntlich zeigen Mutterkornalkaloide zwei pharmakologisch meßbare Effekte. Sie bewirken einmal Kontraktionen an der glatten Muskulatur, von denen die am Uterus ausgelösten therapeutische Verwertung in der Gynaekologie finden. So bewirkt Ergometrin in Bruchteilen eines Milligramms peroral appliziert eine rasch einsetzende starke Kontraktion des Uterus, welche bald wieder abklingt. Die Alkaloide mit Polypeptidstruktur zeigen die gleiche Wirkung, nur tritt sie später ein und hält länger an. Der zweite Effekt ist dadurch gekennzeichnet, daß Mutterkornalkaloide die Wirkung des Adrenalins am Uterus umzukehren vermögen. Diese sog. sympathikolytische Wirkung ist die Grundlage der therapeutischen Anwendung der Mutterkornalkaloide in der inneren Medizin und ist auf die Alkaloide vom Polypeptidtypus, die wasserunlöslichen Alkaloide beschränkt. Setzt man im pharma-

kologischen Experiment die Wirkung des Ergotamin sowohl bei der Kontraktion des Uterus wie auch bei der Adrenalinumkehr gleich eins, so kann man die Wirkungsstärke anderer Alkaloide im Vergleich messen. In Tabelle 1 sind solche Ergebnisse aus den Arbeiten von E. Rothlin (7) zusammengestellt.

Wirksamkeit beim Kaninchen:	Uterus in situ, Tonus- erhöhung u. Rhythmus	Adrenalin- hemmung am isolierten Uterus
	Ergotamin = 1	Ergotamin = 1
Lysergsäure	0,05	0,005
Ergin	0,05	0,0025
Ergometrin	2	0,0025
Ergotamin	1	1
Ergotaminin	0	0,2 - 0,16
"Ergotoxin"	0,5	1
"Ergotinin"	0	0,01

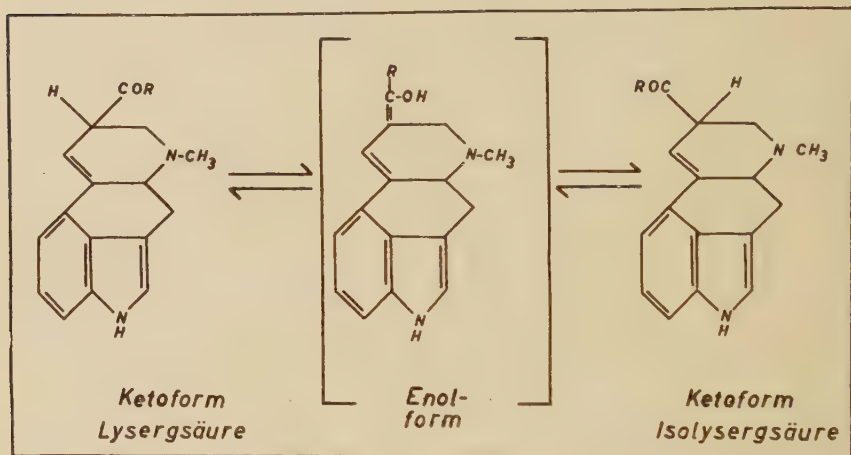
Tabelle 1

Daraus ergibt sich zunächst für die uterine Wirkung, daß das Ergometrin etwa doppelt so kräftig wirkt wie Ergotamin. Die Spaltprodukte besitzen nur einen Bruchteil dieser Wirksamkeit, während die Vertreter der Isolysergsäurereihe, Ergotaminin und "Ergotinin" praktisch keine Wirkung zeigen. Für den sympathikolytischen Effekt gilt nach diesen Versuchen, daß die Spaltprodukte, wie auch Ergometrin bedeutungslos gegenüber Ergotamin sind. Während Ergotamin und "Ergotoxin" hier etwa gleichwertig getestet sind, zeigen die entsprechenden Alkaloide der Isolysergsäurereihe einen erheblichen Wirkungsabfall. Somit sind die genuinen Alkaloide als Träger der pharmakologischen Wirkung anzusehen, während die Spaltprodukte und Derivate der Isolysergsäure praktisch bedeutungslos im pharmakologischen Versuch sind. Im Organismus dagegen kann durchaus eine Wirkung der rechtsdrehenden Isomeren durch die

längere Verweildauer zustande kommen. Wie groß dieser Effekt ist hängt von dem sich einstellenden Gleichgewicht der Alkaloidpaare ab. Damit stehen in Übereinstimmung die Auslassungen von M. Pöhm (8), welcher zu der Frage der Wirksamkeit der rechtsdrehenden Isomeren wie folgt Stellung nimmt: "Völlig unklare Ansichten bestehen jedoch über die Wirkung und Verwendbarkeit der aus den natürlichen Alkaloiden gebildeten rechtsdrehenden Isomeren. Manche Autoren halten sie völlig unwirksam. Wir fanden jedoch, daß diese Alkaloide ca 25 % der sympathikolytischen Wirkung ihrer linksdrehenden Isomeren besitzen; in ihrer uterus-kontrahierenden Eigenschaft dürften sie diesen bei peroraler Anwendung sogar kaum wesentlich nachstehen." Es fehlen aber jegliche experimentelle Unterlagen, so daß die gemachten Ausführungen nur als die Meinung des Verfassers gewertet werden können.

Dem Übergang der Alkaloide der Lysergsäurereihe in die rechtsdrehenden Isomeren kommt demnach eine entscheidende Bedeutung für die Wirksamkeit von Zubereitungen zu. Diese Umlagerung vollzieht sich schnell in hydroxylhaltigen Lösungsmitteln und wird sowohl durch Säuren wie auch durch Alkalien beschleunigt. Erst seit Klärung der konfigurativen Feinheiten des Lysergsäuremoleküls durch A. Stoll und seine Mitarbeiter (9) kann der Isomerisierungsprozeß gedeutet werden. Lysergsäure und Isolysergsäure sind Stereoisomere. Sie unterscheiden sich lediglich in der räumlichen Anordnung der Carboxylgruppe am Kohlenstoffatom 8, wobei die Autoren Anhaltspunkte dafür haben, daß die Carboxylgruppe bei der Lysergsäure näher am Stickstoffatom 6 steht als bei der Isolysergsäure. Steht im Ringsystem an Stelle der Carboxylgruppe eine Methyl- oder Oxymethylgruppe, wie z.B. in den von A. Stoll hergestellten Lysergolen (10) oder den Alkaloiden der Agroclavinreihe, so wird eine Isomerisierung nicht beobachtet, ebensowenig wie bei den an $C_9 - C_{10}$ hydrierten Derivaten der Lysergsäure (11). Daraus hat A. Stoll den Schluß gezogen, daß die Carbonylgruppe in der Carboxylgruppe am Kohlenstoffatom 8 des Lysergsäuresystems für die Isomerisierung verant-

wortlich ist. Sie enolisiert in Hydroxylgruppen enthaltenden Lösungsmitteln und stellt damit ein Gleichgewicht zwischen Lysergsäure- und Isolysergsäurederivaten ein (Formelbild 4).



Formelbild 4

Die Enolisierungstendenz der Carbonylgruppe wird durch die Doppelbindung an C₉ - C₁₀ entscheidend verstärkt, weil damit in der Enolform ein System von 6 konjugierten Doppelbindungen entsteht.

Wo das in Lösung sich zwischen den linksdrehenden Alkaloiden und ihren rechtsdrehenden Isomeren nach bestimmter Zeit einstellende Gleichgewicht für die einzelnen Alkaloide liegt ist bisher nicht beschrieben. Daß die Geschwindigkeit, mit welcher sich das Gleichgewicht einstellt von äußeren Faktoren abhängig ist, so von der Konzentration der Lösung, der Art des Lösungsmittels, dessen PH-Wert und vor allem von der Temperatur, ist zu erwarten. Es ist ferner nicht schwer einzusehen, daß bei dieser Reaktion die Natur des Substituenten R an der Carboxylgruppe der Lysergsäure auf die Lage des Gleichgewichtes einen wesentlichen Einfluß haben wird.

Für die präparative Darstellung eines Alkaloids geht man daher so vor, daß aus dem vorhandenen Gleichgewicht die gewünschte Base in schwerlöslicher Form zur Ausscheidung gebracht wird. Dies kann z.B. im System Ergotamin $\rightleftharpoons$ Ergotaminin (12) durch Auskristallisieren des schwer löslichen Ergotaminins aus der Lösung erreicht werden. Man arbeitet dabei in methanolischer Lösung, worin das Löslichkeitsprodukt von Ergotaminin rasch überschritten wird. Schließlich ist das gesamte Ergotamin in Ergotaminin umgelagert. Durch Zusatz einer Spur Eisessig wird dieser Prozeß beschleunigt, so daß bei Siedehitze innerhalb einer Stunde die Umlagerung nahezu quantitativ verlaufen ist.

In wässriger Weinsäure ist Ergotaminin relativ besser löslich, so daß es innerhalb einer bestimmten Konzentration nicht mehr ausfällt. Dadurch wird nach dem Erreichen des Gleichgewichtszustandes zwischen den beiden Isomeren dieser nicht mehr gestört, die Lösung bleibt von diesem Zeitpunkt an relativ stabil. Damit erklärt sich die von E. Rothlin (13) beobachtete Wirkung von 10 Jahre alten Gynergenpräparaten, bzw. die relative Haltbarkeit dieses und ähnlicher Präparate.

Auch die Rückverwandlung von Ergotaminin in Ergotamin ist möglich (12); dazu wird die gute Löslichkeit der rechtsdrehenden Base in Eisessig und die Schwerlöslichkeit von Ergotaminsulfat in Eisessig-Methanol ausgenutzt. Die Umlagerung vollzieht sich auch hier nach dem gleichen Prinzip, indem aus dem Gleichgewicht das eine Isomere in schwerlöslicher Form zur Abscheidung gebracht wird. In ähnlicher Weise können bei anderen Alkaloiden Umwandlungen präparativ durchgeführt werden.

Etwas anders dagegen liegen die Verhältnisse beim Ergocornin (14). Hier führt die sonst übliche und schonende Umlagerung durch Kochen in Methanol nicht zum Ziel, da Ergocorninin als einzige Ausnahme in diesem Lösungsmittel besser löslich ist als seine linksdrehende Komponente. Man lagert daher "fraktioniert" nach folgendem Prinzip um: In einer Lösung des Ergocornins in alkoholischer Kalilauge hat sich nach

45 Minuten das Gleichgewicht zwischen den beiden isomeren Formen eingestellt, was an der Konstanz der optischen Drehung beobachtet werden kann. Durch Einleiten von Kohlendioxyd wird Kalilauge neutralisiert und die Lösung unter Vakuum auf die Hälfte des Volumens eingedampft. Das Gemisch der Isomeren wird nach Verdünnen mit Wasser mehrmals mit Methylenchlorid ausgeschüttelt und das Lösungsmittel nach dem Trocknen über glühtem Natriumsulfat verdunstet. Der Rückstand wird in Essigester gelöst, woraus das Ergocorninin nach dem Verdünnen mit Äther auskristallisiert. Die Mutterlauge, welche Ergocornin enthält wird verdunstet und der Rückstand zur erneuten Isomerisierung mit alkoholischer Kalilauge versetzt. Nach viermaliger Wiederholung dieses Vorgangs ist nahezu alles Ergocornin umgelagert.

Ähnlichen Schwierigkeiten begegnet man bei der präparativen Darstellung von Ergometrinin aus Ergometrin. Wegen der relativ guten Löslichkeit der rechtsdrehenden Base erfolgt die Umlagerung nicht quantitativ, sondern sie bleibt nach Erreichen des Gleichgewichtszustandes auf dieser Stufe stehen. So konnten S. Smith und G.M. Timmis (15) nach einstündigem Erhitzen einer Ergometrinlösung aus dieser nur 35 % Ergometrinin isolieren. Bei Rückverwandlung der rechtsdrehenden Base waren nach 1/2-stündigem Kochen mit alkoholischer Kalilauge dagegen 68 % in die Linksform umgelagert. Hier scheint demnach das Gleichgewicht unter diesen Bedingungen stark auf der Seite des Ergometrins zu liegen, was auch die immer wieder beobachtete physiologische Wirksamkeit von alten Mutterkornauszügen erklärt.

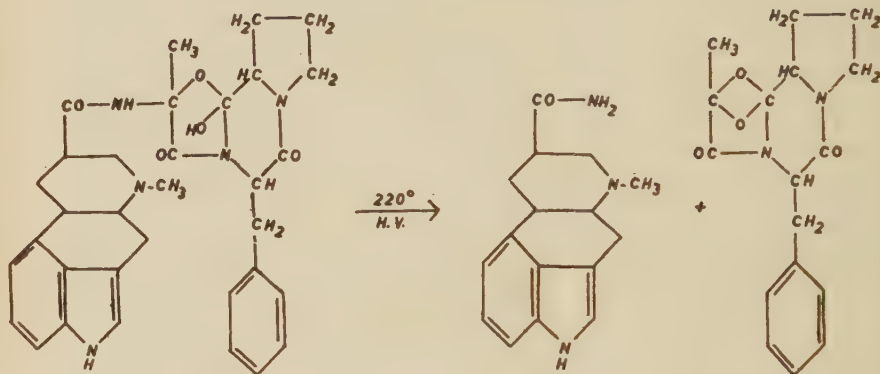
Während bei der Umlagerung oder Isomerisierung das Alkaloidmolekül intakt bleibt, erfährt es bei höheren Temperaturen eine Zersetzung welche das Molekül aufspaltet. So ist bekannt daß die Mutterkornalkaloide keinen Schmelzpunkt zeigen, sondern sich bei höherer Temperatur zersetzen. G. Barger und A.J. Ewins (16) berichteten als erste über ein weißes Sublimat, welches bei der thermischen Zersetzung von Ergotininpräpara-

ten entsteht und welches die beiden Autoren als Dimethylbrenztraubensäure identifizieren konnten. Weitere Produkte der thermischen Spaltung isolierten S. Smith und G.M. Timmis (17) bei der Strukturaufklärung von Ergosin. Dabei entsteht neben Brenztraubensäureamid 1-leucyl-1-prolin-lactam. Erstes zerfällt bei alkalischer Hydrolyse in Brenztraubensäure und Ammoniak, letzteres ergibt nach saurer Verseifung 1-Leucin und 1-Prolin. Als thermische Spaltstücke von Ergokryptin und Ergocornin (18) sowie von Ergotamin (12) wurden neben wenig α -Ketosäureamid die entsprechenden Diketopiperazinderivate beobachtet.

Zum genauen Studium dieses Reaktionsverlaufes eignen sich besser die Dihydroalkaloide (19), weil das abgespaltene Dihydrolysergsäureamid sich nicht mehr in die Iso-Form umlagern kann und auch in geringerem Maße der oxydativen Zersetzung unterliegt. So zerfallen sie beim Erhitzen im Hochvakuum bei 220° in Dihydrolysergsäureamid und ein Spaltstück, welches noch sämtliche Kohlenstoffatome des Peptidkomplexes enthält. Daneben wurde auch etwas Diketopiperazin beobachtet, doch erfolgte die thermische Spaltung im wesentlichen nach dem im Formelbild 5 gezeigten Schema, wobei in den Spaltstücken alle Atome des Ausgangsmaterials vorhanden sind.

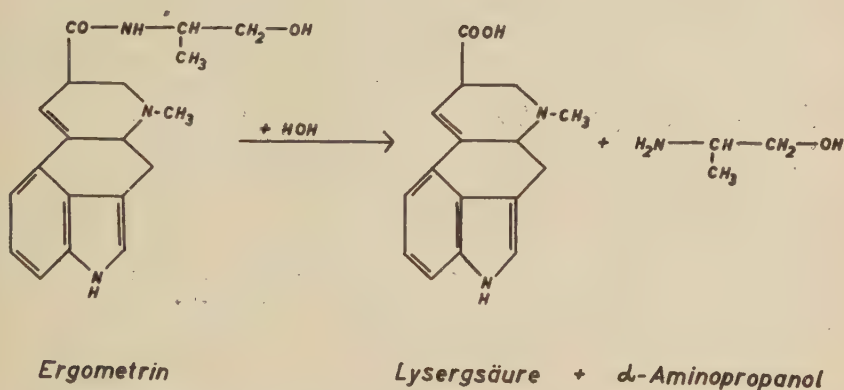
Die "Primärreaktion" bei trockenem Erhitzen stellt also eine Spaltung dar, ein direktes Auseinanderbrechen des Alkaloidmoleküls. Sie vollzieht sich durch Verschiebung des beweglichen Wasserstoffatoms der tertiären Hydroxylgruppe am Kohlenstoff des Prolincarboxyls zur Iminogruppe an der Carbonylgruppe des Lysergsäurerestes, welcher damit als Lysergsäureamid abgespalten wird. Die frei gewordenen Valenzen am Sauerstoffatom des Prolincarboxyls und am Kohlenstoffatom der α -Oxy- α -Aminosäure vereinigen sich zu einem Viererring. Der abgespaltene Peptidkomplex ist gegenüber Säuren relativ stabil, wird aber bereits von Spuren Alkali wie auch bei trockenem Erhitzen in die α -Ketosäure und das dementsprechende Diketopiperazin, das Phenylalanyl-prolin-lactam, zer-

legt. Auch das Lysergsäureamid ist weiteren Zersetzungsreaktionen ausgesetzt. So können diese "Sekundärreaktionen" im Anschluß an die Spaltung die verschiedensten Abbauprodukte ergeben.



Formelbild 5

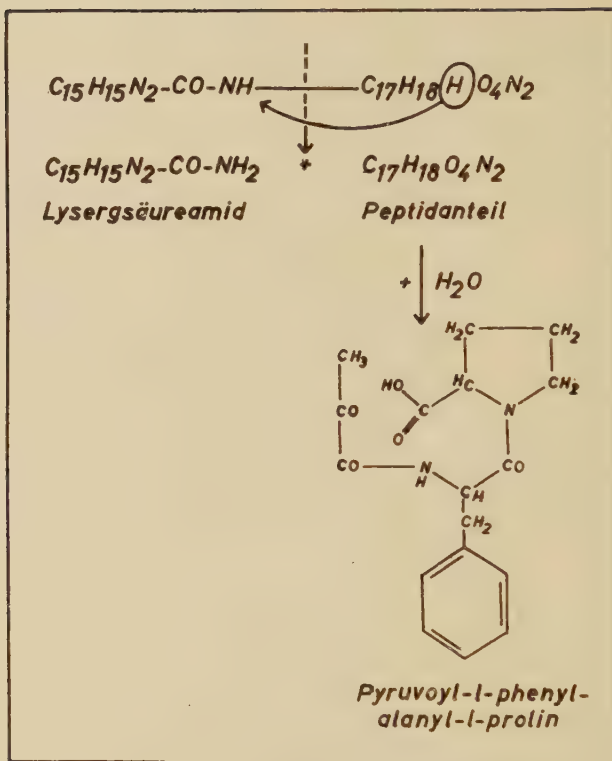
Die Spaltung der Mutterkornalkaloide durch Wasserstoffverschiebung unter Bildung von Lysergsäureamid und Peptidkomplex ist nur bei den Alkaloiden möglich, welche den beweglichen Wasserstoff besitzen, den Alkaloiden mit Polypeptidstruktur. Das Ergometrin kann diese Spaltungsreaktion nicht erleiden. Es zerfällt dagegen in wässriger Lösung unter Einwirkung von starken Säuren oder Laugen im Sinne einer echten Hydrolyse in seine beiden Bausteine Lysergsäure und α -Aminopropanol. Erstere wurde von W.A. Jacobs und L.C. Craig (6) nach alkalischer Verseifung der Base mit weingeistiger Kalilauge gewonnen, während S. Smith und G.M. Timmis (15) aus dem salzsauren Hydrolysat α -Aminopropanol als Spaltstück isolieren konnten (Formelbild 6).



Formelbild 6

Energische alkalische Hydrolyse mit wässrigem Alkali spaltet aus den Polypeptiden ebenfalls Lysergsäure heraus, während unter milderen Bedingungen mit alkoholischer Kalilauge Ergin resultiert. Es wurde als Spaltprodukt im Jahre 1932 von S. Smith und G.M. Timmis (20) erstmalig isoliert. Durch weitere drastische Behandlung dieser Base mit Alkali wurde daraus eine Säure, die Lysergsäure erhalten (21). Zu der gleichen Zeit erzielten W.A. Jacobs und L.C. Craig (22) ähnliche Ergebnisse und fanden bei der Behandlung von Ergin mit Kalilauge ebenfalls Lysergsäure und Ammoniak. Durch Vergleich der Abbauprodukte mit denen welche S. Smith und G.M. Timmis erhielten, konnte durch Strukturaufklärung das Ergin als Lysergsäureamid identifiziert werden (23).

Durch vorsichtige partielle Spaltung des Ergotamins mit 0,8 Äquivalenten Kaliumhydroxyd gelang es A. Stoll (24) die Reaktion so zu steuern, daß nicht das übliche Diketopiperazinderivat und Brenztraubensäure erhalten wurden, sondern Pyruvoyl-1-phenylalanyl-1-prolin in 10 %iger Ausbeute als Zwischenprodukt isoliert werden konnte. Formelbild 7 zeigt diesen Zerfall schematisch.



Formelbild 7

Mit überschüssigem Alkali jedoch setzt im Peptidteil nach Aufspaltung des Viererringes ein weiterer Zerfall durch Verseifung der säureamidartigen Bindung zwischen dem α -Oxy α -Aminosäure-carboxyl und der Aminogruppe der "variablen" Aminosäure ein. So entstehen die Diketopiperazine und Brenztraubensäure. Das sind diejenigen Substanzen, welche in der Literatur immer wieder beschrieben wurden und welche erstmalig W.A. Jacobs und L.C. Craig (25) bei der alkalischen Spaltung von Ergotininpräparaten isolierten. Die Autoren erhielten neben Lysergsäure, Dimethylbrenztraubensäure und Ammoniak noch eine Peptidfraktion, welche nach saurer Hydrolyse dl-Phenylalanin und dl-Prolin lieferte. Weitere Di-pep-

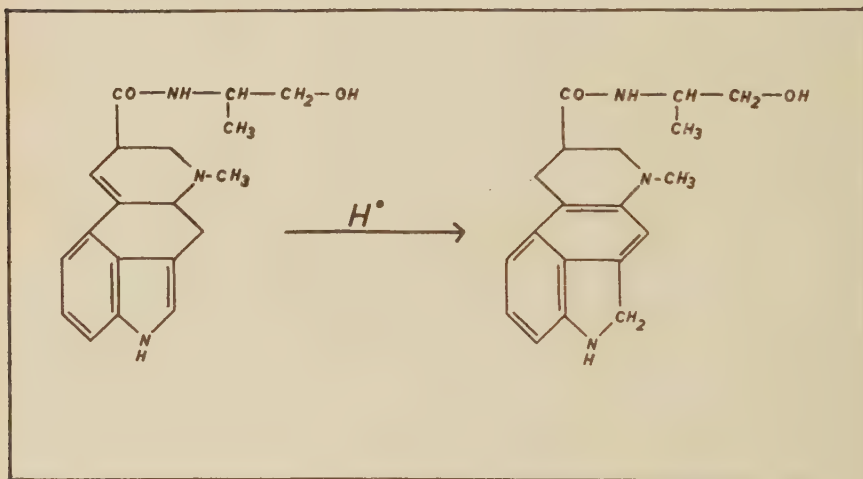
tide, z.T. zu Piperazinen reduziert, wurden noch bei zahlreichen anderen alkalischen und sauren Hydrolysen (26) erhalten. Um sie zu verseifen mußte mit starkem Alkali gekocht werden, während man bei energischer saurer Hydrolyse aus den Alkaloiden direkt die Aminosäuren erhält.

Danach kann auch die Zersetzung der Alkaloide mit Polypeptidcharakter in wässrigem Milieu so gedeutet werden, daß als Primärreaktion eine Wasserstoffverschiebung und damit der Zerfall des Alkaloids in Lysergsäureamid und den Peptidkomplex erfolgt. In den Sekundärreaktionen erfolgt die weitere Aufspaltung der Spaltstücke. Im Formelbild 8 sei dies für Ergotamin schematisch skizziert.

Daraus wäre zu folgern, daß Ergometrin in wässrigem Milieu beständiger hinsichtlich der Spaltung sein müßte als die Alkaloide mit Polypeptidstruktur. Eigene Untersuchungen über die Haltbarkeit von Ergometrin und Ergotamintartrat haben tatsächlich ergeben, daß 0,1 %ige Lösungen der Alkaloide in 2 %iger Natronlauge sich durchaus verschieden verhalten. So wurden in der Ergotaminlösung bei Zimmertemperatur bereits nach 5 Stunden die ersten Anzeichen einer Alkaloidspaltung beobachtet, während in der Ergometrinlösung unter denselben Bedingungen solche erst nach 10 Tagen nachweisbar waren.

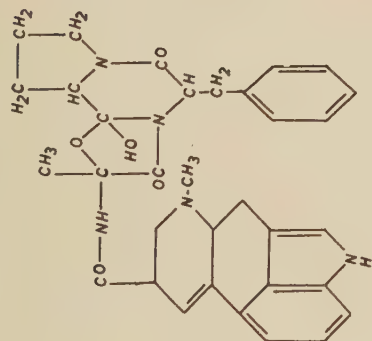
Eine weitere Wertminderung der Alkaloide ist durch die Möglichkeit der Umwandlung der Lysergsäure in saurem Medium gegeben, auf welche von A. Stoll bereits früher aufmerksam gemacht wurde (27). Sie beruht auf der Verschiebung der Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen 9 und 10, wobei die für das Indolsystem charakteristische Farbreaktion mit dem Reagens nach van Urk verschwindet. Die entstehenden Umwandlungsprodukte wurden in einer neueren Arbeit durch A. Stoll identifiziert (28). Es handelt sich, wie am Beispiel des Ergometrins gezeigt wird, um eine durch Protondonatoren bewirkte irreversible Umwandlung des Ergometrins in das dazu isomere Benz-(cd)-indolin-Derivat. Zuerst stellt sich in der Lösung das Gleichgewicht zwischen der links- und rechts-

drehenden Form des Alkaloids ein, dann erst beginnt die verhältnismäßig langsam verlaufende Umwandlung, wobei die Abnahme der Blaufärbung nach van Urk mit dem Verschwinden des Lysergsäureabkömmlings und der Bildung des Indolinderivates parallel geht. Die Reaktionsgeschwindigkeit wird durch Temperaturerhöhung stark begünstigt. Das isolierte Reaktionsprodukt wird als eine äußerst empfindliche Substanz beschrieben, welche sich an Luft rasch rot bis braunviolett färbt (Formelbild 9).



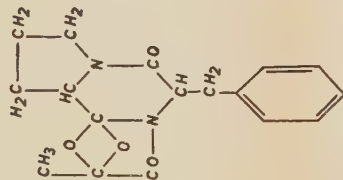
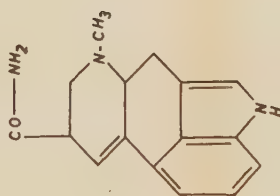
Formelbild 9

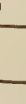
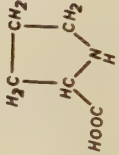
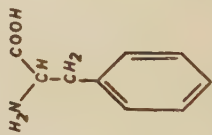
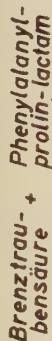
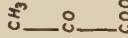
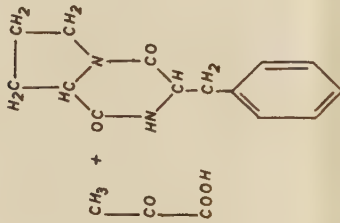
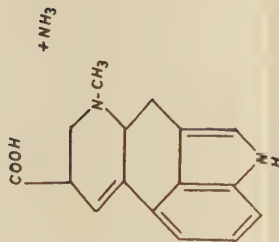
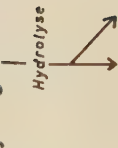
In diesem Zusammenhang sei auch noch auf das Benz-cd-indolin als solches hingewiesen, welches bereits früher dargestellt und als gut kristallisierende Substanz beschrieben wurde (29). Sie wird von Luftsauerstoff leicht oxydativ verändert, was vor allem in saurem Medium der Fall ist. So entsteht innerhalb von wenigen Sekunden eine tief blaue Färbung wenn die Base in Eisessig mit Luft zusammen geschüttelt wird. Diese Reaktion ist zum Nachweis auch von sehr kleinen Mengen Benz-cd-indolin wohl geeignet. A. Stoll hat den blauen Farbstoff, dem möglicherweise die folgende indigoide Struktur



Ergotamin

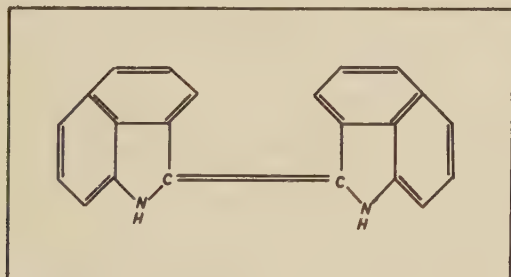
Spaltung





Schema der Zersetzung von Ergotamin

zukommt (Formelbild 10), zu isolieren versucht, erhielt jedoch nur ein anscheinend nicht einheitliches blauschwarzes Pulver. Im Gegensatz zur freien Base erwiesen sich das am Stickstoff azetylierte Benz-cd-indolin und seine Derivate als beständig.



Formelbild 10

Erfahrungsgemäß werden Alkaloidlösungen beim Lagern unter Licht- und Lufteinfluß dunkel, langsamer dahingegen unter Ausschaltung dieser beiden Faktoren. E. Rothlin (30) berichtete über Verfärbungen von Gynergenpräparaten, wenn die Lösungen nicht vor Licht und Luft geschützt wurden. Der Autor sieht in den Verfärbungen ein charakteristisches Zeichen für die Zerstörung des Alkaloidmoleküls. Dabei ist die Frage, ob es sich bei den erwähnten Veränderungen um eine Oxydation durch Aufnahme von Sauerstoff handelt, oder ob sie im Sinne einer Dehydrierung verläuft, noch völlig offen. Sie kann als Sekundärreaktion entstehen am Doppelbindungssystem nach Enolisierung des Lysergsäurecarboxyls, oder durch Dimerisierung von zwei Alkaloidmolekülen über das -Kohlenstoffatom des Indolsystems nach dessen Dehydrierung (vgl. Formelbild 10), oder sie kann auf sonstige, in ihrem Mechanismus noch nicht erkannte Weise eintreten. In trockener Form werden die Alkaloide vor Licht und Luft geschützt aufbewahrt als haltbar beschrieben.

Bei der Verarbeitung von Mutterkornalkaloiden ist also zu beachten, daß diese vor allem in wässrigen oder alkoholischen Lösungen chemische Veränderungen erfahren. Während die Umlagerungsreaktion von der Lysergsäure- in die Isolysergsäurereihe führt, ergibt die Spaltungsreaktion bei den Alkaloiden mit Polypeptidcharakter primär Ergin und einen Peptidkomplex, welche durch anschließende sekundäre Hydrolyse in Lysergsäure bzw. Peptidbausteine zerfallen können. Das Ergometrin ist beständiger, weil es dieser Spaltungsreaktion nicht unterliegt, sondern nur hydrolytisch aufgespalten werden kann. Ferner führt der Übergang in die Benzindolinreihe durch Verschiebung der Doppelbindung von C_{9-10} nach C_{10-5} zu sehr zersetzlichen Substanzen, wie auch die allgemeine Oxydation durch Licht und Luft leicht gefärbte, höhermolekulare Produkte ergibt. In allen diesen Fällen aber entstehen Produkte, welche pharmakologisch gesehen im besten Falle nur einen Bruchteil der Wirksamkeit der genuinen Alkaloide aufweisen oder gar unwirksam sind.

Es ist deshalb verständlich, daß flüssige Arzneizubereitungen, welche Mutterkornalkaloide enthalten, nicht sehr beständig und damit nicht wirkungskonstant sein können. Das gilt einmal für Auflösungen von Reinalkaloiden in wässrigem Milieu, wo eine Umlagerung praktisch nur schwer zu vermeiden sein dürfte. Von noch größerer Bedeutung sind diese den therapeutischen Wert der Zubereitungen mindernden Reaktionen für galenische Präparate. Wenn man sich diesbezüglich die Herstellungsvorschriften der beiden verbreitetsten galenischen Zubereitungen des *Extractum Secalis cornuti fluidum* und des *Extractum Secalis cornuti spissum* ansieht ist es nicht verwunderlich, daß diese Präparate nach der Herstellung in vielen Fällen kaum wirksam und bald ohne Wirkung sind. Es erscheint daher durchaus verständlich, daß in der Therapie vorzugsweise Auflösungen von Reinalkaloiden verwendet werden, bei welchen man bei der Herstellung wenigstens von einem definierten Wirkungswert ausgeht, dessen mit der Zeit erfolgende Minderung unter entsprechenden Vor-

sichtsmaßnahmen erträglicher gehalten werden kann. Es ist daher zu erwarten, daß in einem neuen Arzneibuch Reinalkaloide Aufnahme finden werden. Die Alkaloide Ergotamin und Ergometrin haben hierfür eine gute Chance. Wenn auch eine galenische Zubereitung für den gleichen Zweck in Aussicht genommen werden sollte, so könnte es sich nur um einen Trockenextrakt handeln. Bei der Verarbeitung von Mutterkornalkaloiden sollten grundsätzlich trockene Arzneiformen den Vorrang haben. So wird heute überwiegend bei peroraler Applikation die Drageeform gewählt, um Licht und Luft als wertmindernde Agentien von den Alkaloiden fernzuhalten. Abgesehen davon, daß dies eine unwirtschaftliche Arzneiform darstellt, erscheint die Herstellung nicht ganz ohne Gefahren für den Wirkstoff. Es war daher von Interesse zu prüfen, ob diese Rohstoffe auch in Tablettenform haltbar zu verarbeiten wären. Daß Lösungen unter den Zubereitungen nicht ganz zu umgehen sind, steht außer Frage. Hierfür müssen allerdings Vorschriften ausgearbeitet werden, die möglichst wirkungskonstante Zubereitungen ergeben und deren Kontrolle leicht ermöglichen. Beide Formen aber setzen die Kenntnis vom Chemismus der wertmindernden Reaktionen und deren eingehendes Studium voraus. Damit ergab sich als erste Aufgabe, einfache analytische Prüfungen zu finden, welche in möglichst kurzer Zeit gestatten, den Ablauf dieser Umsetzungen zu verfolgen. In der einschlägigen Literatur finden sich zur Frage der analytischen Erfassung der Wertminderung von Mutterkornalkaloide enthaltenden Arzneiformen nur spärliche und unzulängliche Angaben. Die qualitative Analyse der Wirkstoffe dagegen, vor allem mit Hilfe der papierchromatographischen Technik ist ungleich umfangreicher bearbeitet. Inwieweit sie für obige Aufgabe verwertbar sind soll im folgenden an Hand der Literaturangaben zunächst diskutiert werden.

Die quantitative chemische Bestimmung der Mutterkornalkaloide erfolgt heute im allgemeinen mit p-Dimethylaminobenzaldehyd in schwefelsaurer Lösung nach van Urk (31). Ein Teil weinsaurer Alkaloidlösung ergibt mit zwei Teilen Reagens unter Einhaltung gewisser Bedingungen eine der Alkaloidkonzentration entsprechende Blaufärbung. Diese wird mit einem Kolorimeter gemessen und gegen die Blaufärbung einer Testsubstanz ausgewertet. Der Nachteil dieser Bestimmung, die auf der Reaktion des Lysergsäureanteils beruht, liegt darin, daß nicht nur die genuinen Alkaloide, sondern in derselben Weise auch die therapeutisch wertlosen Umlagerungs- und Verseifungsprodukte mit erfaßt werden. Es kann also der "Blauwert" der deklarierten Menge wirksamer Substanz entsprechen, die Lösung aber nur mehr einen Bruchteil oder im Extrem keinen pharmakologischen Wirkungswert besitzen. Oxydationsvorgänge setzen den "Blauwert" meistens herab. So stand in einem Fall ein schlecht verschlossenes Fläschchen von "Gynergen liquidum" zur Untersuchung. Die Lösung war trübe und graugrün ausgeflockt. Unter ultravioletterm Licht fluoreszierte sie gelbgrün. Die Bestimmung des "Blauwertes" mit dem Reagens nach van Urk ergab noch 320 μ pro ml, berechnet als Ergotamintartrat. Dies sind 32 % des deklarierten Gehaltes. Fällt die Reaktion nach van Urk dagegen negativ aus, so sind therapeutisch wirksame Mutterkornalkaloide nicht vorhanden. Finden wir einen "Blauwert", so muß dieser wiederum nicht von genuinen Wirkstoffen herrühren. Es können auch umgelagerte Alkaloide oder Abbauprodukte vom Typ der Lysergsäure oder der Isolysergsäure vorliegen.

Die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse der von verschiedenen Autoren durchgeführten Haltbarkeitsuntersuchungen von Alkaloidzubereitungen durch Ermittlung des "Blauwertes" sind aus diesen Gründen nur sehr bedingt brauchbar. So prüften S.A. Schou und M. Tønnesen (32) die Stabilität wässriger Lösungen von Ergometrin und Ergotoxinäthansulfonat. Je drei Versuchsreihen wurden angesetzt: ohne Wärmeanwendung, zweistündiges Erwärmen der Lösungen auf 80° C und einstündiges

Erhitzen der Lösungen auf 100°C . Ergotoxinäthansulfonat erwies sich dabei als die instabilere der beiden Substanzen. Innerhalb von 6 Monaten waren 65 % des Alkaloids zerstört, während Ergometrin in demselben Zeitraum nur 19 % "Blauwertverlust" verzeichnete. Dieser Wert erhöhte sich beim Ergometrin auf 35 % bei derjenigen Lösung, die vor der Lagerung 2 Stunden auf 80°C erwärmt worden war und erreichte 70 % bei der durch einstündiges Erhitzen auf 100°C vorbehandelten Lösung. Die unter Anwendung von Wärme bereiteten Lösungen von Ergotoxinäthansulfonat gaben nach 6 Monaten keine Reaktion mehr mit dem Reagens nach van Urk. Die Abhängigkeit der Abnahme des "Blauwertes" vom PH-Wert beim Erwärmen dieser Lösungen vermittelt Tabelle 2.

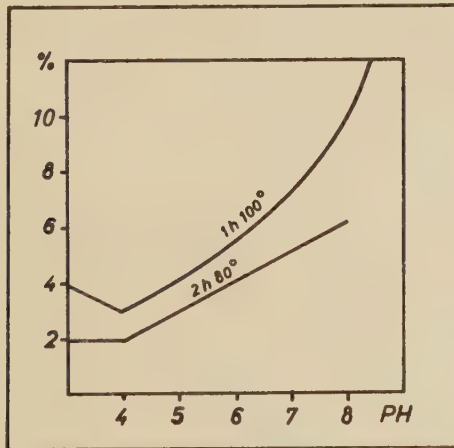


Tabelle 2

(nach S.A. Schou und M. Tønnesen)

Im gebräuchlichen PH-Bereich zwischen PH 3 - 7 zeigten Ergometrinlösungen demnach nach zweistündigem Erwärmen auf 80°C eine Abnahme des "Blauwertes" von 2 - 5 % und nach einstündigem Erhitzen auf 100°C eine solche von 3 - 7 %. Tabletten welche 0,5 mg Ergometrin pro dosi enthielten, besaßen noch nach 6 Monaten ihren anfänglichen "Blauwert".

Ähnliche Ergebnisse erzielten G.E. Foster und G.A. Stewart (33). Zur peroralen Applikation bestimmte Tabletten von Ergometrinmaleat ergaben innerhalb von 6 Jahren einen Abfall des "Blauwertes" auf 88 %. Injektionen von Ergometrinmaleat, nach den Bedingungen der Britischen Pharmakopoe 1948 hergestellt, hatten nach 5 1/2 Jahren noch 85 % "Blauwert", während Ampullen, die nicht unter Stickstoff abgefüllt wurden sich rasch braun färbten und einen schwarzen Niederschlag bildeten. Der "Blauwert" sank hierbei auf 62 % ab. Besondere Beachtung verdient die Untersuchung von Ergometrinmaleat-Injektionen welche 11 Jahre lang in Indien, also in tropischem Monsunklima gelagert wurden. Die Ampullen waren nach dieser Zeit nicht verfärbt und besaßen noch 80 % ihres ursprünglichen "Blauwertes". Da dieser möglicherweise auch auf das Vorhandensein von rechtsdrehenden Isomeren zurückzuführen war, versuchten die Autoren die Umlagerung durch Messung der optischen Aktivität zu verfolgen, was aber wegen der viel zu geringen Konzentration der Lösungen (0,02 - 0,05 %) nicht möglich war. Deshalb wurden 1,5 %ige Lösungen von Ergometrin und Ergometrinmaleat unter genau denselben Bedingungen wie sie für Injektionslösungen vorgeschrieben sind hergestellt und 1/2 Stunde lang bei 120° C sterilisiert. Vor und nach der Sterilisation wurden von beiden Lösungen die optischen Drehungen gemessen und daraus Rückschlüsse über das Ausmaß der Umlagerung gezogen. Diese betrug danach bei Ergometrinmaleatampullen 15 % und bei Ergometrinmaleatlösungen nur 3,5 %. Es ist aber zu bedenken, daß derartige Untersuchungen nur dann zu einem einwandfreien Ergebnis führen können, wenn die Untersuchungs-lösungen keine Verseifungsprodukte enthalten. Da diese selbst wiederum optisch aktiv sein können, haben solche Bestimmungen nur bedingten Wert. Hier hätte die zusätzliche Bestimmung des "Blauwertes" u.U. einen weiteren Rückschluß ermöglicht.

Zur schnellen Prüfung von Mutterkornzubereitungen, speziell von Ergotaminpräparaten auf Ergotaminin empfahl A. Kofler (34) das Ausschütteln der Untersuchungslösungen mit Äther. Entweder nach einer Reinigung durch Chromatographie an Aluminiumoxyd

oder direkt wurde nach tropfenweisem Verdunsten des Äther-extraktes auf einem Objektträger der Abdampfückstand aus Azeton zur Kristallisation gebracht. Dabei bildete Ergotamin langgestreckte trapezförmige Kristalle der Ergotamin-Wasser-Verbindung, während Ergotaminin in drei- bis fünfeckigen Blättchen auskristallisierte. Die Autorin konnte damit Ergotaminin in "Gynergen"-liquidum, -Ampullen und -Tabletten nachweisen (35).

Ebenfalls durch Mikrokristallisation gelang G. Kessler (36) der qualitative Nachweis der wasserunlöslichen Mutterkornalkaloide in Drogen und Trockenextrakten. Die Auftrennung der einzelnen Alkaloide erfolgte auf einer Aluminiumoxyd-säule nach Brockmann, wobei Ergocristinin, Ergocristin, Ergotaminin und Ergotamin in dieser Reihenfolge im Eluat erschienen. Die wasserlöslichen Basen Ergometrin und Ergometrinin blieben neben den Abbauprodukten auf der Säule haften. Nach Identifizierung der einzelnen Fraktionen durch Mikrokristallisation erfolgte ihre quantitative Bestimmung durch kolorimetrische Messung der mit van Urk'schem Reagens entstandenen Blaufärbungen.

Diese beiden Verfahren, welche sich der chromatographischen Trennung der Mutterkornalkaloide an Aluminiumoxyd bedienen, benötigten jedoch Wirkstoffmengen in der Größenordnung einiger Milligramme. Sind diese nicht vorliegend, so kommt als Arbeitsweise nur noch die Papierchromatographie in Frage.

Da im Lysergsäuremolekül eine basische Gruppe vorhanden ist, welche für die Salzbildung mit anorganischen und organischen Säuren verantwortlich zeichnet, kann man auch von dieser Eigenschaft zur Verringerung der Wanderungsgeschwindigkeit der Alkaloide auf dem Papier Gebrauch machen. So wandert Ergometrin auf Whatman-Papier Nr. 1 in mit Wasser gesättigtem Butanol mit der Lösungsmittelfront, während es auf Zusatz von Essigsäure einen RF-Wert von nur 0,59 aufweist und sich von Ergometrinin, welches unter diesen Bedin-

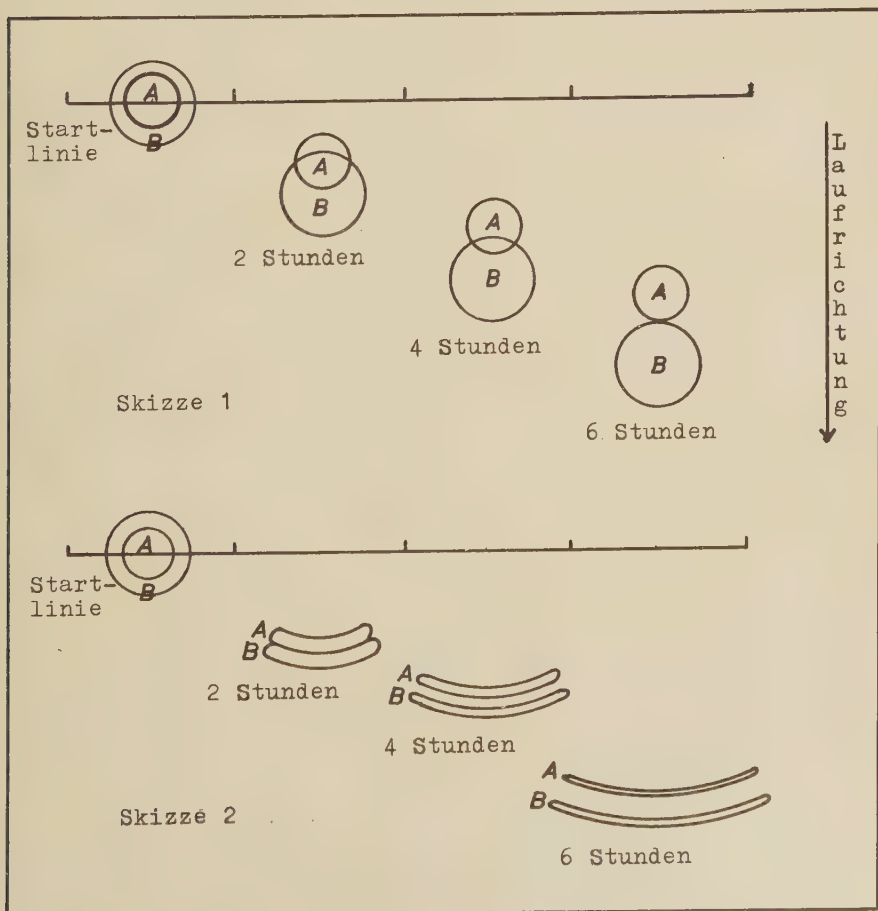
gungen einen RF-Wert von 0,68 besitzt, trennen läßt. Die Alkaloide mit Polypeptidnatur laufen in diesem System mit der Lösungsmittelfront, zeigen RF-Werte zwischen 0,95 und 1,0 und lassen sich weiter nicht auftrennen. Diese ersten papierchromatographischen Untersuchungen von Mutterkornalkaloiden verdanken wir G.E. Foster, J. Macdonald und T.S.G. Jones (37). Damit ist die Möglichkeit gegeben Ergometrin neben Ergometrinin zu erkennen und gegebenenfalls noch auf das Vorhandensein von wasserunlöslichen Basen zu prüfen. Für die ersten beiden Alkaloide kann diese Methode sogar zu einer quantitativen Schätzung herangezogen werden.

Der Nachteil dieser und aller ähnlichen in der Literatur beschriebenen Verfahren ist vor allem die lange Zeitdauer, die für das Entwickeln der "Längenchromatogramme" erforderlich ist. So erfolgt die Auftrennung der einzelnen Substanzen in einer luftdicht verschlossenen Apparatur, die zuvor mit den Dämpfen des betreffenden Lösungsmittelgemisches gesättigt sein muß. Zu diesem Zweck wird ein Teil desselben in einer Glasschale auf den Boden des Kastens gestellt, bis sich nach ca 24 Stunden eine gesättigte Atmosphäre in dem Gefäß gebildet hat. Das Entwickeln des Chromatogramms geschieht zweckmäßig über Nacht, da in der Regel hierzu zwischen 12 und 18 Stunden benötigt werden, wonach sich das Trocknen des entwickelten Chromatogramms anschließt. Aus diesen Gründen ist diese Arbeitsweise für Serienanalysen nur bedingt geeignet.

In zahlreichen Vorversuchen wurde nach einer für Reihenuntersuchungen brauchbaren Methodik gesucht. Sie ergab sich in der Technik der "Rundfilterchromatographie" auf Petrischalen nach L. Rutter (38) mit dem von G.E. Foster und Mitarbeitern (37) angewandten Lösungsmittelgemisch Butanol-Eisessig-Wasser im Verhältnis 4:1:5. Zur Ausführung wurde in ein Rundfilter von 16 cm Durchmesser (Schleicher und Schüll 2045 b) längs zur Faserrichtung des Papiers vom Rand bis zum Mittelpunkt ein 8 mm breiter Docht eingeschnitten und nach unten umgeknickt. Nach Auftragen des Substanzgemisches in

dem Filtermittelpunkt wurde das so vorbereitete Papier zwischen eine mit dem Lösungsmittelgemisch gefüllte Petrischale und deren Deckel gelegt, wobei der Docht in die Flüssigkeit eintauchte. Das Lösungsmittel sog sich langsam hoch und breitete die Substanzen - bedingt durch die Faserrichtung des Papiers - in schmalen Ellipsen auf dem Rundfilter aus.

Die wesentlich größere Trennschärfe der Rundfilterchromatographie kann folgendermaßen erklärt werden:



Chromatographiert man auf- oder absteigend, so kann die Substanz A, die sowohl im Startpunkt, als auch im entwickelten Chromatogramm die Fläche eines Kreises einnimmt, von der Substanz B, die ebenfalls kreisförmig verteilt ist, nur dann scharf getrennt werden, wenn die Mittelpunkte der beiden Kreise genügend weit voneinander entfernt sind (Skizze 1). Bei einem Rundchromatogramm dagegen behält die Substanz nicht die kreisförmige Fläche, die sie ursprünglich innehatte, sondern sie nimmt die Form einer immer schmaler werdenden Bande ein, je weiter sie vom Startpunkt entfernt ist (Skizze 2).

Neben dem besseren Trenneffekt bietet die Rundfilterchromatographie noch den Vorteil der Zeitersparnis. Ohne große Vorbereitungen, also ohne vorherige Sättigung der Atmosphäre, ist ein Rundfilterchromatogramm von 10 cm Durchmesser in ca. 2 Stunden und ein ebensolches von 15 cm Durchmesser in ca. 4 - 5 Stunden entwickelt. Die Möglichkeit, auf dem Rundfilterchromatogramm Vergleichssubstanzen mitlaufen zu lassen, zeigten O. Lüderitz und O. Westphal (39) in ihrer "Segmentmethode". Dabei gibt man die zu untersuchenden Lösungen nicht direkt auf den Mittelpunkt des Filterpapiers, sondern auf einen kleinen, um den Mittelpunkt gezogenen Kreis von etwa 3 cm Durchmesser, welcher jetzt als "Startlinie" dient. Die einzelnen Substanzen bilden beim Entwickeln keine geschlossenen Kreise bzw. Ellipsen, sondern nur noch Kreissegmente. Der Vergleich der unbekannten Segmente mit den "Testsektoren" ist eine Identifizierung der einzelnen Substanzen gut möglich.

Unter diesen Bedingungen liegt der RF-Wert von Ergometrin bei 0,69 und der von Ergometrinin bei 0,79. Die wasserunlöslichen Alkaloide laufen mit der Lösungsmittelfront und besitzen RF-Werte $> 0,95$. Die Alkaloide werden auf dem entwickelten Chromatogramm durch Bestrahlen mit ultravioletterm Licht sichtbar gemacht. Dabei fluoreszieren Ergometrin und Ergometrinin leuchtend blau, während die Alkaloide der Ergotamin- und der Ergotoxingruppe eine mehr bläulichweiße Fluoreszenz zeigen.

Die Nachweisgrenze für Ergometrin und Ergometrinin auf dem Rundfilterchromatogramm wurde durch Chromatographie von Verdünnungsreihen mit jeweils abnehmendem Alkaloidgehalt festgestellt. Sie beträgt für die beiden Alkaloide je 2μ , die gerade noch erkennbar sind. Durch Chromatographie eines Gemisches von Ergometrin mit wechselndem Ergometrininingehalt konnten neben 46μ Ergometrin noch 4μ Ergometrinin nachgewiesen werden. Dies besagt: Werden zu der papierchromatographischen Untersuchung jeweils 50μ Alkaloidgemisch aufgetragen und ist hierbei im entwickelten Chromatogramm ein schwacher Ring von Ergometrinin erkennbar, so liegt das rechtsdrehende Isomere zu etwa 8 % vor. Eine geringere Ergometrininmenge als 8 % ist bei diesem Verfahren nicht mit Sicherheit zu erkennen.

G.E. Foster, J. Macdonald und T.S.G. Jones (37) versuchten ferner die papierchromatographische Identifizierung eines Gemisches der polypeptidhaltigen Mutterkornalkaloide. Dazu wurde das Gemisch 16 Stunden lang mit konz. Salzsäure bei 100°C hydrolysiert und das entstandene Reaktionsprodukt papierchromatographisch auf die einzelnen, aus der abgebauten Peptidkette resultierenden Aminosäuren untersucht. Da aber Phenylalanin sowohl im Ergocristin als auch im Ergotamin enthalten ist und aus Ergosin und Ergokryptin gemeinsam Leucin abgespalten wird, ist die Begrenzung dieser Methode gegeben. L. Fuchs und M. Pöhm (40) trennten daher nach einem Verfahren von H. Brindle und seinen Mitarbeitern (41) zuerst die Alkaloide der Ergotamingruppe von denen der Ergotoxingruppe papierchromatographisch ab und unterwarfen die beiden Fraktionen getrennt der sauren Verseifung. Durch Papierchromatographie der Hydrolysate konnte auf Grund der einzelnen freien Aminosäuren eine Aussage über das vorgelegene Alkaloidgemisch gemacht werden. Für diesen speziellen Zweck der möglichst quantitativen Verseifung des Peptidkomplexes empfiehlt K. Macek (42) für 5 mg Alkaloid in 5 ml 10 %iger Natronlauge Erwärmen auf 70°C während 20 Stunden. Zur sauren Verseifung hingegen wird 1 mg Alkaloid in 1 ml 6 n-Salzsäure 16 Stunden lang bei

80° C hydrolysiert. Auch diese Methodik der papierchromatographischen Erfassung der hydrolysierten Aminosäuren kommt wegen der Zeitdauer für Serienanalysen nicht in Frage.

Für die papierchromatographische Trennung der intakten Mutterkornalkaloide vom Polypeptidtyp waren zu Beginn dieser Arbeit in der Literatur zwei verschiedene Arten der Trennung beschrieben. Bei der einen erfolgte das Entwickeln des Alkaloidgemisches auf gepuffertem Papier mit einem organischen Lösungsmittel. H. Brindle und seine Mitarbeiter (43) imprägnierten chromatographisches Papier mit einer Pufferlösung von niedrigem PH und entwickelten das Chromatogramm mit Äther oder Chloroform. Damit gelang den Autoren wohl die Abtrennung der beiden Alkaloide Ergotamin und Ergotaminin von jenen der Ergotoxingruppe, nicht aber die Auftrennung letzterer selbst in die einzelnen Komponenten, da bei der "Längenchromatographie" die Flecken sich gegenseitig durch "Schwanzbildung" häufig überlappen. Bei der zweiten kam es zu einer Präparierung des Papiers mit organischem Lösungsmittel (z.B. Silikon) und Entwickeln des Alkaloidgemisches mit einem wässrigen Puffersystem, sog. "Phasenumkehr". Bei dieser Methodik, von V.E. Tyler und A.E. Schwarting (44) angewandt, wurde das Filterpapier mit einem bestimmten Silikon behandelt und die Alkaloide mit der wässrigen Phase eines auf PH 3 gepufferten Butanol-Systems entwickelt. Der Nachteil dieses Verfahrens liegt aber darin, daß u.a. die RF-Werte der aufgetrennten Alkaloide zu nahe beieinander liegen, nämlich zwischen 0,5 und 0,8. Dadurch wird die Bestimmung einer größeren Anzahl von Alkaloiden nebeneinander erschwert.

Später hat dann A.M. Berg (45) die von H. Brindle (43) auf Längenchromatogrammen durchgeführten Trennungen der Alkaloide vom Polypeptidtyp mit Hilfe der Rundfiltertechnik verbessert. Der Autor arbeitete mit gepufferten Rundfiltern von 30 cm Durchmesser, welche in einem Exsikkator mit Benzol oder Äther unter Zusatz von Äthanol während 20 Stunden entwickelt wurden. Damit gelang die Trennung von Ergometrin,

Ergometrinin, Ergotamin, Ergotaminin, Ergocristin und Ergocristinin. Ferner war die Auftrennung des "Ergotoxins" in seine drei Komponenten Ergocristin, Ergokryptin und Ergocornin möglich. Die eigenen Versuche zum Nacharbeiten dieser Trennungen gelangen nur unbefriedigend; sie waren wohl nicht umfangreich genug um alle Ergebnisse bestätigen zu können.

Vor einigen Monaten veröffentlichten K. Macek und seine Mitarbeiter (46) eine weitere Trennungsmöglichkeit für Ergotamin und Ergotaminin. Die Autoren tränkten das Papier mit einem polaren organischen Lösungsmittel - Formamid - und entwickelten das Chromatogramm mit Benzol, eventuell unter Zusatz von Chloroform.

Zuletzt berichteten noch A. Stoll und A. Rüegger (47) über eine neue papierchromatographische Trennung der Mutterkornalkaloide, welche auf einer "echten Verteilungschromatographie mit umgekehrten Phasen" beruht. Hierbei stellt ein Formamid-Wasser-Gemisch die mobile Phase dar, während das Papier mit einer Mischung von Phthalsäuredimethylester und Isopropyläther beladen wird. Das Verfahren erlaubt wohl die getrennte Bestimmung der einzelnen Alkaloide innerhalb einer Gruppe, also innerhalb der Ergotamin- bzw. der Ergotoxingruppe, doch haftet auch ihr, wie allen anderen erwähnten Verfahren der Nachteil eines relativ großen Geräteaufwandes und vor allen Dingen einer langen Zeitdauer an. So kann, wie die Arbeit von A. Stoll zeigt, frühestens nach 26 Stunden eine Aussage über das Vorliegen einzelner Alkaloide gemacht werden.

Somit ist auch heute noch mit keiner der so zahlreichen papierchromatographischen Veröffentlichungen auf dem Gebiet der Mutterkornalkaloide eine Möglichkeit gegeben, sich rasch, innerhalb von wenigen Stunden über eine Veränderung der heute in der Therapie gebräuchlichsten Alkaloide Ergometrin und Ergotamin zu unterrichten. Dieses Ziel wurde auf folgendem Weg erreicht.

H. Brindle (43) und später auch A.M. Berg (45) trennten Ergotaminin von Ergotamin auf gepuffertem Filterpapier bei PH 3 mit einem organischen Lösungsmittel. Warum sollte es nicht möglich sein, auch umgekehrt zu verfahren und nicht das Papier auf einen bestimmten PH-Wert einzustellen, sondern nicht präpariertes Papier direkt mit einer Pufferlösung, eventuell unter Zusatz eines organischen Lösungsmittels zu entwickeln? Dann müßte aber auch das Entwickeln der Chromatogramme mit Hilfe der Rundfilter-Technik ebenso rasch und einfach möglich sein, wie dies bei der Trennung von Ergometrin und Ergometrinin mit dem Butanol-Eisessig-Wasser-Gemisch der Fall ist.

Die in dieser Richtung unternommenen Versuche führten auch zu brauchbaren Ergebnissen. Es zeigte sich eine gewisse Abhängigkeit der RF-Werte vom PH-Wert des Lösungsmittels und von der Menge organischer Zusätze zu diesem. Nach den so gewonnenen Erkenntnissen wurde die Citrat-Salzsäurepufferlösung PH 4,5 nach "Sörensen" mit einem Zusatz von 5 % organischer Phase (Essigester und Azeton zu gleichen Teilen) als günstigste Entwicklungsflüssigkeit gefunden. Mit diesem "Ergotamin-Trennungsgemisch" liegt auf Papier Nr. 63 der Firma Macherey und Nagel der RF-Wert von Ergotamin bei 0,45 und von Ergotaminin bei 0,56. Etwas besser zwar gelang die Auftrennung der beiden Isomeren auf Schleicher & Schüll Papier 2045 b (Herstellungsjahr 1952/53). Leider war Papier genau der gleichen Charge nicht mehr nachzubekommen, die Versuche mußten daher auf das Papier der Firma Macherey und Nagel Nr. 63 umgestellt werden, welches sich für den speziellen Zweck den neuen Chargen von Schleicher & Schüll 2045 b überlegen zeigte.

Die RF-Werte von Ergotamin und Ergotaminin zeigten oftmals eine etwas stärkere Streuung als diejenigen von Ergometrin und Ergometrinin. Dies ist durch das relativ leichte Verdunsten des organischen Lösungsmittelanteils im "Ergotamin-Trennungsgemisch" bedingt. Daher wurden die zu untersuchenden Ergotaminlösungen auf "Segmentchromatogrammen" im Ver-

gleich mit reinem Ergotamin bzw. Ergotaminin als Testsubstanzen entwickelt (vgl. Seite 26). Da auf einem entwickelten "Segmentchromatogramm" die Alkaloide nur die bananenförmige Fläche eines Kreissegmentes einnehmen und sich nicht auf einem ganzen Kreis, bzw. einer Ellipse ausbreiten, konnte unter diesen Bedingungen die Nachweisgrenze für Ergotamin und Ergotaminin auf je 2μ festgelegt werden. Beim Chromatographieren von 50μ Alkaloidgemisch, bestehend aus $47,5 \mu$ Ergotamin und $2,5 \mu$ Ergotaminin wurde auf einem "Segmentchromatogramm" Ergotaminin noch erkannt, was einem Gehalt von 5 % Ergotaminin entspricht. Geringere Mengen an rechtsdrehender Base waren nicht mehr mit Sicherheit erkennbar.

Von Ergotamin mit Ergotaminin ist eine Molekülverbindung, das Sensibamin bekannt. Es kann sich u.U. in Ergotaminlösungen aus bereits umgelagertem Ergotaminin mit noch vorhandenem Ergotamin bilden. Dadurch könnte aber Ergotaminin eventuell dem papierchromatographischen Nachweis entgehen, oder könnte durch Sensibamin Ergotamin vorgetäuscht werden. Dies gab den Anlaß, das Verhalten von Sensibamin als Probesubstanz beim Chromatographieren mit dem "Ergotamin-Trennungsgemisch" zu untersuchen. Würden die oben angestellten Erwägungen zutreffen, so müßte aus Sensibamin lediglich ein Ring erhalten werden. Dabei könnte der RF-Wert mit demjenigen von Ergotamin, oder aber auch von Ergotaminin übereinstimmen. Es besteht auch die Möglichkeit eines eigenen RF-Wertes für Sensibamin. Sollte nun das neu entwickelte Verfahren mit dem "Ergotamin-Trennungsgemisch" für eine Beobachtung der Ergotamin-Ergotaminin-Umlagerung tatsächlich zu gebrauchen sein, so muß sich Sensibamin in zwei Ringe auftrennen, nämlich zu gleichen Teilen in Ergotamin und Ergotaminin. Dies traf auch zu, die beiden aufgetrennten Segmente stimmten sowohl in ihren RF-Werten wie auch in der Intensität ihrer Fluoreszenz mit den Sektoren der Testsubstanzen Ergotamin und Ergotaminin überein.

Bei Untersuchungen von "Gynergen Ampullen" und von "Gynergen liquidum" (1/2 Jahr nach Verpackung!) wurde in beiden Präparaten Ergotaminin nachgewiesen und damit die Kofler'schen Ergebnisse bestätigt. Auf Grund der Fluoreszenzintensität wurde der Ergotamininanteil auf ca 20 % grob geschätzt. In Bellergal-Dragees konnte an Mutterkornalkaloiden nur Ergotamin bestimmt werden, Ergotaminin war im Gegensatz zu den Befunden von A. Kofler nicht nachzuweisen.

Des weiteren konnten mit dem "Ergotamin-Trennungsgemisch" aus einem am hiesigen Institut aus saprophytischer Kultur gewonnenen Alkaloidgemisch Ergotamin und Ergotaminin durch Vergleich mit Testsubstanzen identifiziert werden. Auf dem Segmentchromatogramm zeigte unter ultravioletter Bestrahlung neben Ergotaminin und Ergotamin noch ein Alkaloidsegment mit RF 0,20 eine bläuliche Fluoreszenz. Diese noch nicht identifizierte Substanz nahm auf einem mit Butanol-Eisessig-Wasser entwickelten Chromatogramm einen RF-Wert von 0,81 ein, während die beiden wasserunlöslichen Alkaloide nahe der Lösungsmittelfront einen RF-Wert von 0,96 zeigten. Der RF-Wert 0,81 stimmt mit demjenigen von Agroclavin überein.

Mit der Ausarbeitung der papierchromatographischen Nachweismethodik für die Alkaloidpaare Ergometrin/Ergometrinin und Ergotamin/Ergotaminin war eine erste Voraussetzung für die Durchführung meiner Untersuchungen gegeben. Die Rundfiltrertechnik erlaubte ein genügend schnelles Arbeiten mit 8 % bzw. 5 % Erfassungsgrenze für die jeweiligen rechtsdrehenden Isomeren. Als nächstes war die Frage zu klären, ob bei dieser Methodik auch die Spaltprodukte der Mutterkornalkaloide zu erfassen wären. Die Spaltprodukte der Mutterkornalkaloide Ergin, Isoergin, Lyserg- und Isolysergsäure sind auf dem Papierchromatogramm an ihrer blauen Fluoreszenz unter ultraviolettem Licht erkennbar. Nach eigenen Versuchen liegt der RF-Wert von Ergin-Isoergin beim Entwickeln der Chromatogramme mit dem Butanolgemisch bei 0,59, während die Lysergsäuren in demselben System einen RF-Wert von 0,51 besitzen. Durch Feh-

len von Vergleichssubstanzen konnten sie zwar nicht exakt identifiziert werden, doch decken sich die gefundenen Werte mit den in der Literatur genannten (44,48).

Interessant sind in diesem Zusammenhang noch einige Beobachtungen, welche in unserem Arbeitskreis gemacht wurden. Im Verlauf von Untersuchungen über Drogenextraktionen wurde auch das Verhalten der Mutterkornalkaloide gegenüber Säuren, Laugen und organischen Lösungsmitteln überprüft. W. Offenbacher (48) benutzte dabei Ergoclain als Testsubstanz und wies auf die Zerstörung der Alkaloide durch starke Säuren, aber auch durch Hydroxylgruppen enthaltende Lösungsmittel, insbesondere durch Alkalien hin, wobei die Zersetzungsgeschwindigkeit sowohl von der Temperatur als auch von der Konzentration der Alkalien und Säuren abhängig ist. Der Autor fand, daß anorganische Säuren, wie die Phosphorsäure und organische Monocarbonsäuren (Essigsäure) insbesondere bei erhöhter Temperatur in Wasser zersetzend auf die Alkaloide einwirken, weniger dagegen Oxyssäuren, z.B. Weinsäure wie auch in organischen Lösungsmitteln die Zersetzungsgeschwindigkeit geringer ist. Die bei diesen Untersuchungen als Folge der Alkaloidzerstörung auftretenden Spaltprodukte versuchte der Autor papierchromatographisch zu erkennen. Er bediente sich dazu des von G.E. Foster und Mitarbeitern (37) benutzten Verfahrens und fand, daß der Abbau von Ergoclain in Natronlauge z.B. ziemlich rasch beginnt. Die innerhalb der gewählten Konzentrationen zuerst nach 20 Minuten auftretenden, im ultravioletten Licht blau fluoreszierenden Spaltprodukte mit RF-Werten zwischen 0,64 und 0,57 wurden als Ergin und Isoergin gedeutet, während die nach einer Stunde auftretenden, ebenfalls an ihrer blauen Fluoreszenz unter ultraviolettem Licht erkennbaren Abbauprodukte mit RF-Werten zwischen 0,53 und 0,47 als Lyserg- und Isolysergsäure angesprochen wurden. In weinsäure Lösungen von Ergoclain entstanden erst nach längerem Erhitzen Abbauprodukte vom Typus des Ergins.

Als ein weiteres Spaltprodukt - von zersetztem Ergometrin herstammend - kann noch freies α -Aminopropanol auftreten, welches auf dem "Butanol-Chromatogramm" einen RF-Wert von 0,34 besitzt, unter der U.V.-Lampe gelblich fluoresziert und mit Ninhydrin positiv reagiert (49). Bei den Alkaloiden mit Polypeptidcharakter sind neben Ergin-Isoergin und den Lysergsäuren entsprechend die Verseifungsprodukte der Peptidkomponente vorhanden. Nach raschem Trocknen der Chromatogramme bei erhöhter Temperatur kann man die abgespaltenen Aminosäuren durch gelbe und rotbraune Fluoreszenz unter ultraviolettem Licht erkennen. So wurde neben Prolin mit RF 0,34 und Phenylalanin mit RF 0,63 noch ein Abbauprodukt unbekannter Konstitution mit einem RF-Wert von 0,42 erhalten, welches bisher in der Literatur nicht beschrieben wurde. Es besteht Grund zur Annahme, daß es sich hierbei um ein Diketopiperazinderivat, nämlich das Phenylalaninprolinlactam handelt, welches bei alkalischer Hydrolyse von Ergotamin als Zwischenprodukt entsteht. Nach K. Heyns und G. Arends (50) haben Polypeptide aus verschiedenen Aminosäureresten aufgebaut RF-Werte, die zwischen denjenigen der freien Aminosäuren liegen. Beim Besprühen des Chromatogramms mit Ninhydrinlösung zeigte Prolin eine Gelbfärbung, Phenylalanin war schwach violett gefärbt und die Farbe des Diketopiperazinderivates war orangerot. So verschieden die Ninhydrinfärbungen zu Beginn auch waren, im Laufe der Zeit verblaßten sie all-

Auch Oxydationsprodukte gewisser Art waren bei den Versuchen teilweise erkennbar. So wurde bei den papierchromatographischen Untersuchungen von Alkaloidlösungen auf dem "Butanol-Chromatogramm" neben den üblichen Alkaloidringen häufig ein gelbgrün fluoreszierender Ring mit RF 0,90 beobachtet. Er trat vornehmlich in Ergometrinlösungen nach längerer Lagerung, oder aber schneller nach Erhitzen der Lösungen auf und wurde als ein Oxydationsprodukt der Alkaloide gedeutet. Um dafür einen Beweis zu erbringen, wurden je 50 ml einer 0,25 %igen wässrigen Ergotaminlösung mit 0,5 ml Wasserstoffsuperoxydlösung versetzt und sowohl bei Zimmertemperatur als auch im Thermostaten bei 70° C aufbewahrt. Nach 3 Stunden wurden die Lösungen

mit van Urk'schem Reagens versetzt, worauf sofort eine gelbbraune Färbung entstand. Die ohne Wasserstoffsuperoxyd angesetzten Vergleichslösungen reagierten mit dem Reagens dagegen mit einer Blaufärbung. Während die Fluoreszenz der Vergleichslösungen leuchtend blau war fluoreszierten die mit Wasserstoffsuperoxyd vorbehandelten Lösungen nach dreistündigem Stehen bei Zimmertemperatur unter Lichteinwirkung blaugrün und nach ebensolangem Erwärmen auf 70°C gelbgrün. Auf dem "Butanol-Chromatogramm" ergaben beide oxydierten Lösungen einen Ring mit dem RF-Wert 0,90. Dieser zeigte im ultravioletten Licht dieselben grünlichen Fluoreszenzerscheinungen.

In Ergometrinlösungen welche 0,1 und 0,15 % Ascorbinsäure enthielten, verzögerte sich der Beginn der Oxydation um ca 5 Wochen. Die ersten Spuren des Oxydationsproduktes mit RF 0,90 waren erst nach 8-wöchiger Lagerung bei Zimmertemperatur erkennbar, während in Vergleichslösungen ohne Ascorbinsäurezusatz dieselbe Substanz bereits nach 3 - 4 Wochen nachgewiesen werden konnte. Auf die Umlagerung und Verseifung des Alkaloidmoleküls hingegen hatte die Ascorbinsäure keinen Einfluß.

So war mit der entwickelten Technik der Rundfilterchromatographie die Möglichkeit gegeben, in Ergometrin- bzw. Ergotaminlösungen die Umlagerungs- und Spaltungsreaktionen relativ gut zu verfolgen. Das wurde für die beiden Alkaloide in 0,1 %igen Lösungen experimentell bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden 0,1 %ige Lösungen bzw. Suspensionen von Ergometrin und Ergotamin in den verschiedensten wässrigen und organischen Lösungsmitteln in weißen Glasstöpselfläschchen gelagert. In bestimmten Zeitabschnitten, erst nach Minuten, dann nach Stunden und später nach Tagen wurden Proben entnommen und papierchromatographisch nach den im Experimentellen Teil dieser Arbeit ausführlich beschriebenen Methoden auf Umlagerungs- und Spaltprodukte geprüft. Um eine Aussage über den Einfluß der Wärme machen zu können wurde in bestimmten Lösungsmitteln auch das Verhalten der Substanzen bei 50°C und 100°C überprüft. Bei organi-

schen Lösungsmitteln wurde in diesen Fällen bei Siedetemperatur des jeweiligen Lösungsmittels gearbeitet. In den folgenden Tabellen sind die Ergebnisse kurz zusammengefaßt. Die dort gemachten Angaben bezüglich Umlagerung, Spaltung und Hydrolyse sind so zu verstehen, daß zu den angegebenen Zeitpunkten bei der gewählten Nachweismethode der Beginn der jeweiligen Reaktion eindeutig festgestellt wurde.

Schwefelsäure 2,9 %ig	Hydrolyse
Phosphorsäure 2,9 %ig	Hydrolyse
Weinsäure 4,5 %ig	Hydrolyse
Weinsäure 30 %ig	Hydrolyse
Essigsäure 3 %ig	Hydrolyse
Eisessig	Hydrolyse
destill. Wasser	Umlagerung
Natr.Bikarbonat 2,5 %ig	Umlagerung
Natr.Karbonat 3,2 %ig	Umlagerung
Ammoniak 1,7 %ig	Umlagerung
Natronlauge 2 %ig	Hydrolyse
Tage	3 6 9 12 15 18 21 24 27

Tabelle 3:

Ergometrin in wässrigen Lösungsmitteln bei 20°

Die Versuchsergebnisse zeigen deutlich eine gewisse Stabilität des Ergometrins in schwach sauren Lösungen bei Zimmertemperatur. Die Base ist in diesem Milieu bis zu 14 Tagen gut haltbar, dann tritt langsam Verseifung des Moleküls ein. In mineralsaurer Lösung dagegen wird die Hydrolyse wesentlich beschleunigt; bereits nach 2 Tagen sind die ersten Anzeichen der Abbauprodukte erkennbar (Tabelle 3). In alkalischen Lösungen unterliegt Ergometrin vorzugsweise der Umlagerung. Sie tritt innerhalb von Stunden ein, verstärkt sich mit Zunahme des PH-Wertes und in stark natronalkalischer Lösung kommt es schließlich zur alkalischen Verseifung des Alkaloidmoleküls.

Methanol	Umlagerung									
Äthanol 90 %ig	Umlagerung									
Äthanol 50 %ig	Umlagerung									
Äther										
Azeton										
Methylen- chlorid										
Chloroform										
Essigester										
Benzol										
Tage	3	6	9	12	15	18	21	24	27	

Tabelle 4:

Ergometrin in organischen Lösungsmitteln bei 20°

In organischen Lösungsmitteln welche Hydroxylgruppen enthalten beginnt die Umlagerung, wie z.B. die Haltbarkeit in Methanol und Äthanol zeigt, innerhalb von 2 bis 3 Tagen (Tabelle 4). Dagegen erleidet Ergometrin in Äther, Azeton, Methylenchlorid, Chloroform, Essigester und in Benzol innerhalb von 4 Wochen bei Zimmertemperatur keine Einbuße an physiologischer Wirksamkeit.

Nach Betrachtung dieser Resultate ist die Art der Wertminderung, also die Umlagerung und Verseifung, abgesehen von der Temperatur, stark abhängig vom PH-Wert des Lösungsmittels. Der folgende Versuch, in welchem Ergometrin bei Zimmertemperatur in verschiedenen Pufferlösungen von PH 1 bis PH 13 gelagert wurde, sollte näheren Aufschluss über diese Verhältnisse geben. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 graphisch dargestellt.

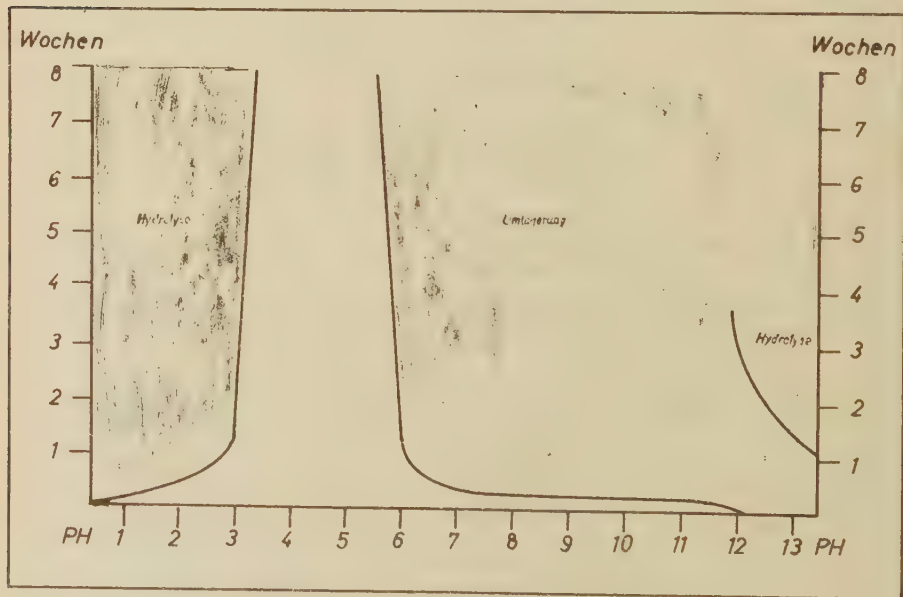


Tabelle 5:

Ergometrin in verschiedenen Pufferlösungen bei 20°

Demzufolge sind für Ergometrinlösungen bei Zimmertemperatur die Gebiete der Hydrolyse und der Umlagerung streng voneinander abgegrenzt. Während Ergometrin in saurem Bereich bis PH 3,5 nur der Verseifung unterliegt erfolgt die Umlagerung erst ab PH 5,5 und erstreckt sich über das gesamte alkalische Gebiet. Dort tritt bei PH 12 und PH 13 zusätzlich noch alkalische Verseifung des Alkaloidmoleküls ein. Lediglich in dem Intervall zwischen PH 4 und PH 5 erwiesen sich Ergometrinlösungen bei Zimmertemperatur als beständig, sie zeigten in der Beobachtungszeit weder Anzeichen von Umlagerung noch von Verseifung.

Weinsäure 4,5 %ig										
Essigsäure 3 %ig										
Pufferlsg. PH 3										
Pufferlsg. PH 4										
Pufferlsg. PH 4,5										
destill. Wasser										
Pufferlsg. PH 8										
Natr. Bikarbonat 2,5 %ig										
Ammoniak 1,7 %ig										
Tage										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Tabelle 6:

Ergometrin in wässrigen Lösungen bei 50°

Anders dagegen liegen die Verhältnisse bei einer Erhöhung der Temperatur auf 50°C , welche für Ergometrin in wein- und essigsäuren Lösungen neben der Hydrolyse auch zur Umlagerung führen. Sie setzt sogar noch vor Beginn der Verseifung innerhalb von 6 und 7 Tagen ein. In alkalischen Ergometrinlösungen ist Ergometrinin bereits nach 45 Minuten nachweisbar (Tabelle 6).

Beim Erhitzen wässriger, essig- und weinsaurer Ergometrinlösungen auf 100°C konnte Ergometrinin nach 90 Minuten bzw. 3 Stunden nachgewiesen werden. Die ersten Anzeichen der Alkaloidverseifung werden in der wässrigen Lösung nach 2 Tagen, in der essigsäuren nach 24 Stunden und in der weinsäuren Lösung nach 2 Stunden beobachtet (Tabelle 7).

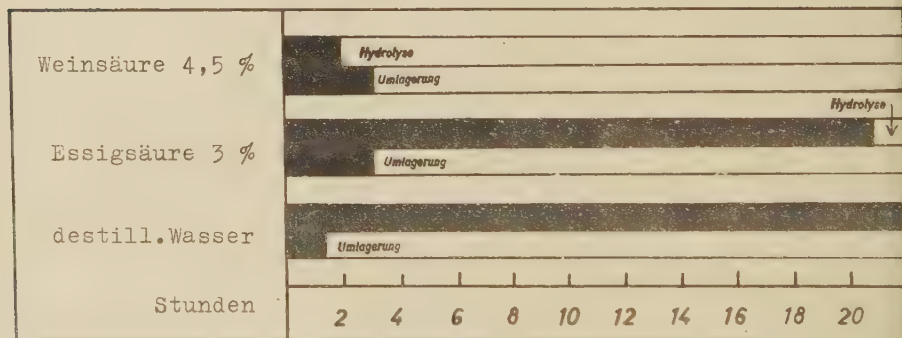


Tabelle 7:

Ergometrin in wässrigen Lösungen bei 100°

In siedenden organischen Lösungsmitteln welche Hydroxylgruppen enthalten, unterliegt Ergometrin innerhalb von 6 Tagen nur der Umlagerung. Sie setzt, wie aus Tabelle 8 zu entnehmen ist, in Methanol und Äthanol nach 3 bis 4 Stunden ein. Auch in siedendem Azeton ist nach 6-tägiger Versuchsdauer eine geringe Spur Ergometrinin nachzuweisen (Tabelle 8).

Methanol					
	Umlagerung				
Äthanol					
	Umlagerung				
Azeton					
	Umlagerung				
Äther					
	Umlagerung				
Benzol					
	Umlagerung				
Tage	1	2	3	4	5

Tabelle 8:

Ergometrin in organischen Lösungsmitteln bei Siedetemperatur

Nach Abschluß der Untersuchungen über die Stabilität flüssiger Ergometrinzubereitungen wurde in analoger Weise die Haltbarkeit von Ergotamintartrat und von Ergotamin-Base in den verschiedensten Lösungsmitteln unter wechselnden Bedingungen überprüft. Die Untersuchungsproben wurden durch Entwickeln der Chromatogramme mit dem "Ergotamin-Trennungsgemisch" auf Umlagerungsprodukte und mit Hilfe der "Butanol-Chromatogramme" auf Spalt- bzw. Verseifungsprodukte geprüft. Dabei ergaben sich zwischen Ergotamintartrat und der freien Base in Bezug auf die Haltbarkeit in Lösungen keinerlei Unterschiede. In Tabelle 9 ist das Verhalten von Ergotamin in wässrigem Milieu bei Zimmertemperatur wiedergegeben.

Die ersten Anzeichen der Alkaloidspaltung werden bei Zimmertemperatur in mineralsauren Lösungen nach 14 Tagen beobachtet. Beständiger zeigen sich die weinsauren Lösungen des Alkaloids, in welchen innerhalb von 4 Wochen keinerlei Spaltprodukte festgestellt wurden. Dagegen erleiden diese Lösungen eine Wertminderung nach 21 Tagen durch Umlagerung des Ergotamins

Innerhalb von 6 Wochen waren keinerlei Anzeichen einer Spaltung oder Umlagerung des Ergotamins festgestellt worden. Erst in 2 %iger Natronlauge unterliegt Ergotamin rasch der Umlagerung und der Molekülspaltung.

Diese Ergebnisse weisen deutlich auf eine Abhängigkeit der wertmindernden Reaktionen vom PH-Wert des jeweiligen Lösungsmittels hin. Um in diese Vorgänge besseren Einblick zu gewinnen wurde Ergotamin bei Zimmertemperatur in genau eingestellten Pufferlösungen 8 Wochen lang gelagert. Die graphische Darstellung der Ergebnisse zeigt Tabelle 10.

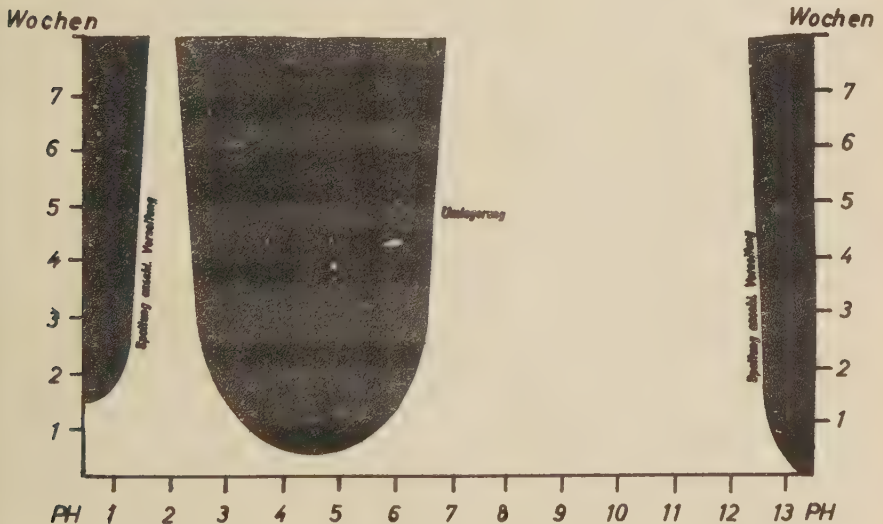


Tabelle 10:
Ergotamin in Pufferlösungen bei 20°

Wie bereits bei der Haltbarkeit von Ergometrin festgestellt, so sind auch in diesem Fall die Gebiete in welchen Ergotamin einer Alkaloidspaltung bzw. Umlagerung unterliegt voneinander abgegrenzt. Die Base unterliegt nur im stark sauren Gebiet um PH 1 sowie im stark alkalischen Milieu um PH 13 der Aufspaltung des Moleküls mit anschließender saurer, bzw. alkalischer Verseifung der Spaltprodukte. In den dazwischen liegenden PH-

Bereichen bleibt das Alkaloidmolekül intakt. Das Gebiet der Umlagerung beschränkt sich auf das Intervall von PH 2,5 bis PH 6,5. Im anschließenden Bereich zwischen PH 7 und PH 12 konnten keinerlei Anzeichen einer Umlagerung, bzw. Spaltung mit anschließender Verseifung von Ergotamin festgestellt werden.

Dieses Ergebnis wurde noch durch kristallographische Untersuchungen erhärtet. Dazu wurden die Niederschläge der Lösungen, welche infolge der Schwerlöslichkeit der Base innerhalb der angewandten Konzentrationen in wässrig-alkalischen Medien entstanden sind einzeln abzentrifugiert und in Methylenchlorid gelöst. Die Alkaloide wurden teils direkt auf dem Objektträger nach Verdunsten des Lösungsmittels aus Azeton zur Kristallisation gebracht, teils nach Auftrennen über einer Aluminiumoxydsäule durch Kristallbild und Papierchromatographie identifiziert. Dabei wurde nur Ergotamin gefunden, Ergotaminin konnte in keinem Fall nachgewiesen werden.

Um die Sicherheit zu haben das Ergotaminin in dieser Menge nicht zu übersehen, wurde zur weiteren Kontrolle Ergotamin in Pufferlösung bei PH 11 unter Zusatz von Methanol gelöst und nach dreiwöchiger Lagerung unter denselben Bedingungen das Sediment wie oben beschrieben papierchromatographisch und kristallographisch untersucht. Auf dem Papierchromatogramm konnten Ergotamin und Ergotaminin im Vergleich mit Testsubstanzen leicht nachgewiesen werden und bei der Mikrokristallisation auf dem Objektträger wurden aus Azeton Ergotamin neben Ergotaminin kristallisiert.

Eine Temperaturerhöhung auf 50° C bewirkte in wässrigen, essig- und weinsäuren Ergotaminlösungen das Auftreten des Umlagerungsproduktes bereits innerhalb von 12 Stunden. Spaltprodukte des Ergotamins konnten wie Tabelle 11 zeigt erst nach 8 bzw. 10 Tagen nachgewiesen werden.

Beim Erhitzen saurer Ergotaminlösungen auf 100° C begann die Umlagerung innerhalb von 30 Minuten und die Spaltung des Alkaloidmoleküls nach 4 bzw. 9 Stunden. Auffällig war das nahezu umgekehrte Verhalten von alkalischen Ergotaminlösungen,

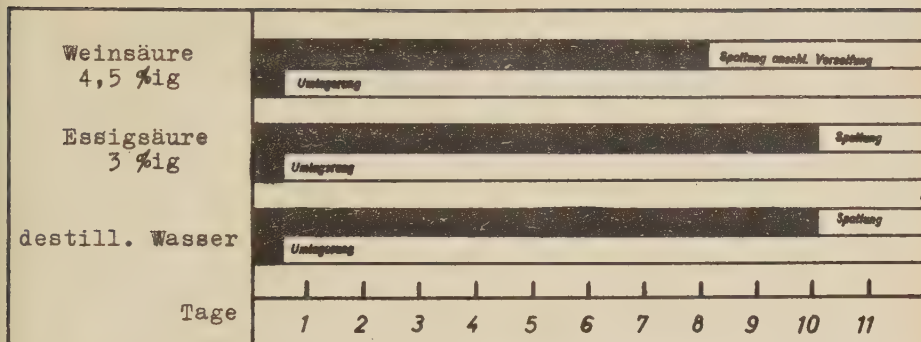


Tabelle 11: Ergotamin in wässrigen Lösungen bei 50°

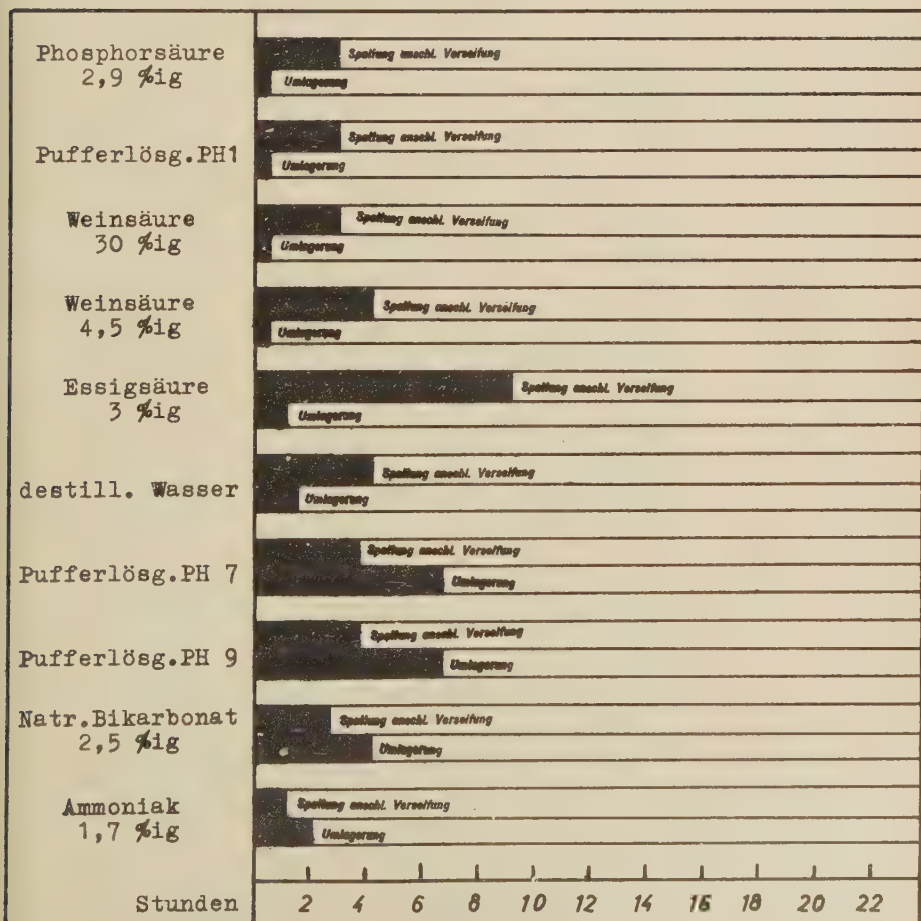


Tabelle 12: Ergotamin in wässrigen Lösungen bei 100°

welche bei Siedehitze zuerst Alkaloidspaltung zeigten während Umlagerung erst später beobachtet wurde (Tabelle 12).

Die Haltbarkeit von Ergotamin in organischen Lösungsmitteln bei Zimmertemperatur entsprach ganz den Erwartungen. In den Alkoholen Methanol, Äthanol und Butanol waren die ersten Anzeichen der Umlagerung innerhalb von wenigen Tagen erkennbar. In Äther, Essigester und Benzol, sowie in den chlorierten Kohlenwasserstoffen konnten im Verlauf von 4 Wochen keine wertmindernden Reaktionen festgestellt werden (Tabelle 13).

Methanol	Umlagerung
Äthanol 90 %ig	Umlagerung
Äthanol 50 %ig	Umlagerung
Butanol	Umlagerung
Äther	
Azeton	
Essigester	
Benzol	
Methylen- chlorid	
Chloroform	
Tage	3 6 9 12 15 18 21 24 27

Tabelle 13:

Ergotamin in organischen Lösungsmitteln bei 20°

Bei Siedehitze treten in Methanol Spuren von Ergotaminin nach 10 Minuten auf, während sich in siedendem Azeton das Umlagerungsprodukt erst nach 15 Stunden schwach nachweisen läßt. In siedendem Methylenchlorid und Benzol ist nach 44 Stunden noch keine Wertminderung des Alkaloids festzustellen (Tabelle 14).

Methanol	
	Umlagerung
Azeton	
	Umlagerung
Methylen- chlorid	
Benzol	
Stunden	2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22

Tabelle 14:

Ergotamin in organischen Lösungsmitteln bei Siedetemperatur

Nach diesen Versuchen wurde die Haltbarkeit von Ergotamin-tartrat in rezepturmäßigen Zubereitungen geprüft. Zu diesem Zweck wurde das Alkaloid zusammen mit Weinsäure nach Benetzen mit etwas Spiritus entweder in Aqua conservans, oder nach Zusatz von 15 % Glyzerin in destilliertem Wasser gelöst. Während in normalen Weinsäurelösungen sich recht schnell Pilze ansiedeln, trat hier bei beiden Lösungen innerhalb der Beobachtungszeit von 12 Wochen kein Pilzbefall ein. In der mit Aqua conservans bereiteten Lösung war der "Blauwert" nach dieser Zeit auf 86 % abgefallen, während er in der mit Glyzerin versetzten Lösung noch 94,5 % betrug. Die ersten Spuren von Ergotaminin waren in beiden Lösungen nach 3 Tagen schwach erkennbar, nach 4 Wochen betrug der Anteil an rechtsdrehender Base auf

Grund grober Schätzung etwa 20 %. Auch nach der Beobachtungszeit von 3 Monaten schien er in beiden Lösungen nicht weiter angestiegen. Eine Aufspaltung bzw. Verseifung des Alkaloidmoleküls wurde während dieser Zeit nicht beobachtet.

Zur Prüfung der Haltbarkeit von Mutterkornalkaloiden in Tabletten wurden ausgehend von der Vorschrift für "Stadaneurin Dragees" aus "Secale concentratum STADA" (Herstellungsjahr 1952) Tabletten mit einem Alkaloidgehalt von 300 μ pro dosi (berechnet als Ergotamintartrat) hergestellt. Die Lagerung erfolgte unter verschiedenen Bedingungen, so unter Vakuum, unter Stickstoff und unter Lufteinwirkung jeweils im Kühlschrank bei + 4° C als auch bei Zimmertemperatur mit und ohne Lichtschutz. In bestimmten Zeitabschnitten wurden je 20 Tabletten einzeln mit Weinsäure extrahiert und die nach Zugabe von van Urk'schem Reagens entstandene Blaufärbung kolorimetrisch ausgewertet. Die Versuche wurden zu Beginn dieser Arbeit in Angriff genommen. Sie dienten dazu, neben der Festlegung von Lagerungs- und Untersuchungsbedingungen den Einfluß bestimmter Begleitstoffe in "Secale concentratum STADA" auf die Wirkstoffe in einer längeren Lagerung festzustellen. Deshalb wurde in diesen orientierenden Versuchen allein auf die Bestimmung des "Blauwertes" Wert gelegt.

In Tabelle 15 ist die Haltbarkeit der einzelnen Chargen graphisch dargestellt. Bei den Tabletten, welche im luftverdünnten Raum gelagert waren machten sich der Lichteinfluß und die Temperaturschwankungen von + 5° bis + 20° C im Blauwert nur wenig bemerkbar. Bei Aufbewahrung unter Stickstoffatmosphäre war unter normalen Temperaturbedingungen eine etwas stärkere Abnahme des "Blauwertes" als bei Lagerung im Kühlschrank zu verzeichnen. Sie wurde durch Lufteinwirkung noch etwas begünstigt, erreichte aber nicht den Wert, auf welchen die Tabletten absinken, die unter Einwirkung von Licht und Luftsauerstoff aufbewahrt wurden. Weniger bemerkbar machten sich diese Faktoren bei kühler Lagerung. Insgesamt aber ergaben diese Prüfungen einen Verlust an "Blauwert", der zu der damaligen Zeit Veranlassung

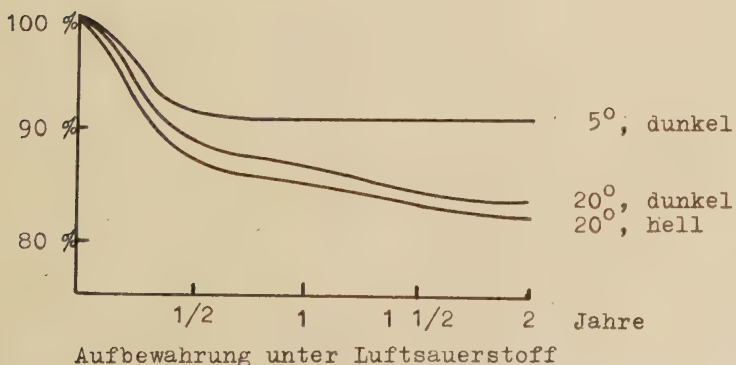
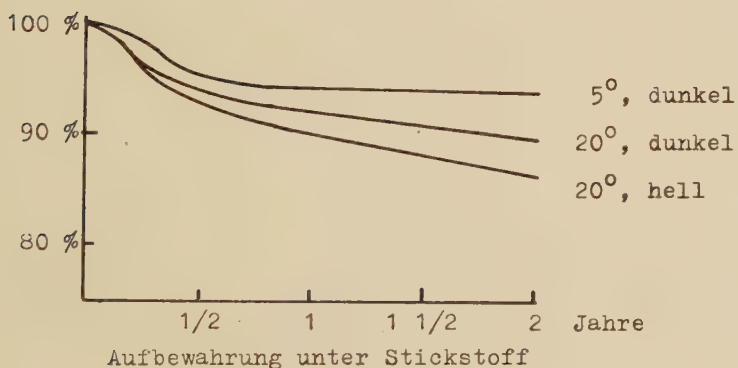
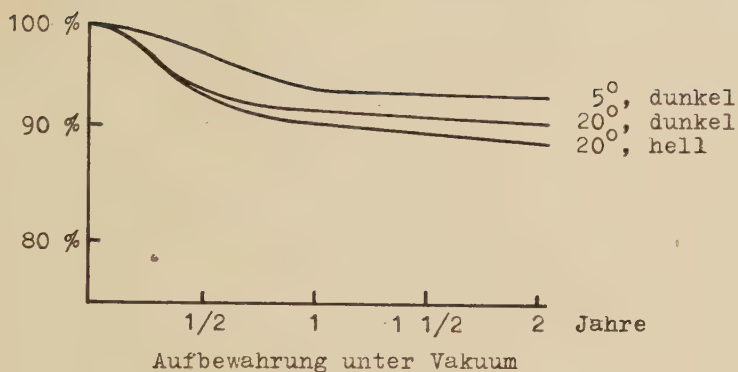


Tabelle 15:

Die Haltbarkeit von Tabletten
mit "Secale concentratum STADA"

gab, die Zusätze in "Secale concentratum STADA" einer Überprüfung auf ihre Eignung zu unterziehen.

Da sich diese Untersuchungen aber lediglich auf die Bestimmung des "Blauwertes" beschränkten gaben sie auch nur über seine Minderung Auskunft, nicht aber - wie bereits eingangs ausgeführt - über eventuelle Umlagerungs- oder Spaltungsreaktionen der Alkaloide. Deshalb wurden Reinalkaloid-Tabletten aus Ergometrin und Ergotamintartrat hergestellt und die Erfahrungen der vorangegangenen Untersuchungen entsprechend verwertet. Bei dieser Gelegenheit konnte durch die Papierchromatographie festgestellt werden, daß Ergometrin- und Ergotamin-tartrattabletten bei feuchter Granulation und bei Anwendung von Temperaturen bis höchstens 40° C beim Trocknen des Granulates keine Einbuße an physiologischer Wirksamkeit erleiden. Die Lagerung der so hergestellten Tabletten erfolgte sowohl im Kühlschrank als auch bei Zimmertemperatur mit und ohne Lichtschutz. Zur Untersuchung wurden die Alkaloide aus den einzelnen Tabletten mit weinsaurem Methanol herausgelöst und die Extraktionslösungen der papierchromatographischen Prüfung unterworfen. Mit Hilfe der "Butanol-Chromatogramme" wurde auf Ergometrinin sowie auf Spalt- bzw. Verseifungsprodukte beider Alkaloide geprüft. Zum Nachweis von Ergotaminin wurde das Papierchromatogramm mit dem "Ergotamin-Trennungsgemisch" nach der "Segmentmethode" entwickelt. Die Bestimmung des "Blauwertes" erfolgte in üblicher Weise nach Extraktion der Wirkstoffe mit 20 %iger Weinsäure. Nach 9-monatiger Lagerung unter den verschiedenen Bedingungen besaßen die Ergometrin- und Ergotamin-tartrattabletten noch ihren vollen Wirkungswert. Es war keine Spaltung der Alkaloide zu beobachten, auch Isomerisation war nicht eingetreten.

Faßt man die erzielten Ergebnisse zusammen so erhält man nochmals eine Bestätigung für die Anschauung, daß die Mutterkornalkaloide in trockener Form unter entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen aufbewahrt relativ gut haltbar sind. Die vorliegenden Resultate, welche allerdings nur eine Beobachtungszeit von

9 Monaten umfassen, zeigen sowohl für Ergometrin- wie auch Ergotamintabletten keinerlei Wertminderung für die Wirkstoffe. Damit erscheint die Möglichkeit der peroralen Applikation über die Tablette gegeben, doch bedarf es noch einer längeren Prüfungszeit um eine endgültige Aussage machen zu können. Eine Aufgabe die im Hinblick auf die Bedeutung für die therapeutische Praxis aber durchgeführt werden sollte.

Es kann keinem Zweifel unterliegen, daß flüssige Zubereitungen von Mutterkornalkaloiden nicht für längere Zeiten ohne Wirkungsverlust hergestellt werden können. Am besten gelingt dies noch für Ergometrin, wenn man Licht und Luft möglichst ausschließt, bei Zimmertemperatur im PH-Bereich von etwa 3,5 bis 5,5. In Übereinstimmung damit sind die im Handel angetroffenen Ergometrin enthaltenden Zubereitungen auf einen PH-Wert von 3,8 - 4 eingestellt. Das Ergotamin indessen zeigt im brauchbaren PH-Bereich die wertmindernde Erscheinung der Umlagerung. In Kombinationspräparaten, die im Handel sind finden wir daher fast immer Ergotaminin, jedoch selten Ergometrinin. (Es mag sein, daß die kleine in diesen Präparaten vorhandene Alkoholmenge die Umlagerung noch begünstigt.)

Für die Gewinnung von Reinalkaloiden ist zunächst das Verhalten in organischen Lösungsmitteln von Bedeutung. In den Alkoholen beginnt bei Zimmertemperatur die Umlagerung nach Stunden, während eine Erhöhung der Temperatur diesen Prozeß erheblich beschleunigt. In Azeton ist die Isomerisierung vor allem der wasserunlöslichen Alkaloide erst bei Siedehitze merklich. In Äther, Benzol, Methylenchlorid, Chloroform dagegen zeigt sich auch bei der Temperatur des Siedens keine derartige Umlagerung.

Im wässrigen Milieu erfolgt bei Anwesenheit starker Laugen sowohl bei Ergometrin wie auch bei Ergotamin rasche Umlagerung welche durch Temperaturerhöhung noch merklich beschleunigt wird. Schwächeren Basen gegenüber wie Ammoniak, Natriumbikarbonat zeigen vor allem die wasserunlöslichen Alkaloide größere Beständigkeit. Während die Isomerisierungserscheinun-

gen für die Reindarstellung der Alkaloide nicht von ausschlaggebender Bedeutung sind - es gelingt ja, diesen Prozeß auch in der rückläufigen Richtung zu beeinflussen - so ist der Prozeß der Spaltung bzw. Hydrolyse der Alkaloide als Verlustquelle hierbei ungleich bedeutsamer. Bei Ergometrin sind es die Mineralsäuren welche auch bei Zimmertemperatur bereits nach Stunden den Beginn der Hydrolyse in Gang bringen, während in organischen Säuren und schwachem Alkali selbst bei Temperaturen bis 50°C doch einige Tage bis zu diesem Zeitpunkt vergehen. Das Ergotamin wird durch 2 %ige Natronlauge ziemlich schnell gespalten während gegenüber organischen Säuren und schwachem Alkali bei Temperaturen bis zu 50°C etwa die gleiche Beständigkeit wie beim Ergometrin zu konstatieren ist. Gegen Mineralsäuren ist das Ergotamin bei normaler Temperatur wesentlich beständiger als Ergometrin. Somit ist die Möglichkeit gegeben bei raschem Arbeiten unter Innehaltung gewisser Vorsichtsmaßnahmen noch mit erträglichen Ausbeuten - von der Droge ausgehend - zu den reinen Wirkstoffen zu kommen.

Wesentlich ungünstiger sind die Voraussetzungen für die Bereitung galenischer Präparate, da hier die Möglichkeit entfällt durch Einschaltung eines gelenkten Isomerisierungsprozesses im Zuge der Aufarbeitung rechtsdrehende Alkaloide in die therapeutisch wichtigeren linksdrehenden umzuwandeln. Hi bleibt die Aufgabe zu lösen durch ein Extraktionsverfahren die Alkaloide möglichst ohne Umwandlung in Lösung zu bekommen und diese dann ohne Anwendung wesentlich erhöhter Temperatur in kurzer Zeit zur Trockne zu bringen. Nach den in dieser Arbeit erzielten Resultaten erscheint das Problem zwar schwierig doch keineswegs unmöglich zu lösen.

Zusammenfassung:

In der vorliegenden Arbeit sind somit die Voraussetzungen geschaffen worden, durch die Kenntnis des Verhaltens der Alkaloide Ergometrin und Ergotamin in den verschiedenen Lösungsmitteln und in Tabletten zu therapeutisch brauchbaren, rezepturmäßigen Zubereitungen der beiden Alkaloide zu gelangen. Durch die Schaffung einer papierchromatographischen Methodik können die den therapeutischen Wert beeinträchtigenden Umlagerungs- und Spalt- bzw. Verseifungsprodukte von Ergometrin und von Ergotamin rasch erfaßt werden und in Verbindung mit der kolorimetrischen Bestimmung nach van Urk ist auch eine Möglichkeit zur quantitativen Überprüfung von Zubereitungen der beiden Alkaloide gegeben.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Papierchromatographische Trennung der Alkaloide Ergometrin und Ergometrinin.

Von den Alkaloiden Ergometrin und Ergometrinin wurden 0,1 % ige Lösungen in 5 % iger Weinsäure hergestellt und durch Vermischen eine Lösung erhalten, welche in einem ml je 500 μ Ergometrin und 500 μ Ergometrinin enthielt.

400 ml Butanol wurden in einem Scheidetrichter von 1 Liter Inhalt mit 100 ml Eisessig und 500 ml destilliertem Wasser versetzt und während einer Stunde mehrmals kräftig geschüttelt. Nach dem Trennen in zwei Schichten wurde die untere, wässrige Phase abgelassen und verworfen, die organische Phase diente als Elutionsmittel für das Papierchromatogramm.

0,05 ml der oben beschriebenen Lösungen wurden mit einer Blutzuckerpipette auf ein Rundfilter von 16 cm $\varnothing$ (Schleicher & Schüll 2045 b) aufgetropft. Dabei breitete sich die Lösung nicht kreisrund auf dem Papier aus, sondern sie nahm eine leicht elliptische Form ein. Die Lage der großen Halbachse der Ellipse zeigte die Laufrichtung des Papiers an. Vom Filterrand aus wurde bis zum Mittelpunkt in der Faserrichtung ein 8 mm breiter Docht eingeschnitten und dieser bis auf eine Länge von 3 cm verkürzt. Der Docht wurde nach unten umgeknickt. Das so vorbereitete Papier wurde auf eine mit 170 ml Elutionsmittel gefüllte Petrischale von 15 cm $\varnothing$ und 2 cm Höhe gelegt, wobei der Docht in die Flüssigkeit eintauchte. Es wurde zur Vermeidung der Verdunstung mit dem umgekehrten Deckel der Petrischale beschwert. Nach einer Laufzeit von 4 bis 5 Stunden in einem dunklen Raum bei annähernd konstanter Temperatur waren die Substanzen auf dem Papier genügend weit aufgetrennt. Nach dem Trocknen in einem dunklen Raum wurde das entwickelte Chromatogramm mit ultravioletter Licht bestrahlt. Dabei fluoreszierten Ergometrin und Ergometrinin in zwei leuchtend blauen Kreisen. Zur Auswertung wurde die Lage der beiden Ringe in Verlängerung des Dochts

tes mit Bleistift gekennzeichnet und die jeweiligen Abstände Startpunkt - Substanzring ausgemessen. Die Division dieser Strecken durch den Abstand Startpunkt - Lösungsmittelfront ergab die einzelnen RF-Werte der Alkaloide. Sie betrugen für Ergometrin $0,69 \pm 0,01$ und für Ergometrinin $0,79 \pm 0,01$ (statistisch gesichert).

Festlegung der Nachweisgrenze.

a) von Ergometrin und Ergometrinin:

Zur Festlegung der Nachweisgrenze der einzelnen Alkaloide wurden abnehmende Mengen einer 0,02 %igen methanolischen Ergometrin- und Ergometrinin-Lösung auf Rundfilter von 16 cm $\varnothing$ (Schleicher & Schüll 2045 b) aufgetropft und mit Butanol-Eisessig-Wasser-Gemisch im Verhältnis 4:1:5 entwickelt. Nach dem Trocknen der Papierchromatogramme waren 2 μ Ergometrin und 2 μ Ergometrinin eben noch nachweisbar.

b) eines Gemisches von Ergometrin und Ergometrinin:

Durch Mischen einer 0,1 %igen methanolischen Lösung von Ergometrin mit einer ebensolchen von Ergometrinin wurde eine Ergometrin-Verdünnungsreihe mit wechselndem Ergometriningehalt von 20 % bis 5 % abnehmend hergestellt.

0,05 ml dieser Lösungen wurden mit Blutzuckerpipetten auf Rundfilter von 16 cm $\varnothing$ (Schleicher & Schüll 2045 b) aufgetropft und mit dem Elutionsmittel Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) entwickelt. Nach dem Trocknen wurden die Papierchromatogramme unter ultraviolettem Licht ausgewertet. In Tabelle 16 sind die einzelnen Ergebnisse zusammengestellt. Die auf einem Rundchromatogramm eben noch erkennbare Ergometrininmenge betrug beim Auftragen von 50 μ Alkaloidgemisch noch 4 μ , dies entspricht 8 %.

Ergometrin + Ergometrinin		Ergometrinin
40,0 †	10,0 †	gut erkennbar
42,5 †	7,5 †	gut erkennbar
44,0 †	6,0 †	gut erkennbar
45,0 †	5,0 †	erkennbar
45,5 †	4,5 †	noch erkennbar
46,0 †	4,0 †	kaum erkennbar
46,5 †	3,5 †	0
47,0 †	3,0 †	0
47,5 †	2,5 †	0
48,0 †	2,0 †	0

Tabelle 16

Papierchromatographie von "Neo-Gynergen" Ampullen.

2 x 0,05 ml "Neo-Gynergen" Ampullenlösung wurden mit einer Blutzuckerpipette auf ein Rundfilter von 16 cm Ø (Schleicher & Schüll 2045 b) aufgetragen und mit Butanol-Eisessig-Wasser-Gemisch (4:1:5) in Petrischalen entwickelt. Nach dem Trocknen des Chromatogrammes fluoreszierte der Ergometrin-Ring mit RF 0,69 unter der U.V.-Lampe leuchtend blau, während Ergotamin nahe der Lösungsmittelfront mit RF 0,96 bläulich-weiße Fluoreszenz zeigte. Ergometrinin konnte nicht nachgewiesen werden.

Papierchromatographie von "Methergin" (Methylergobasin).

Für die papierchromatographische Prüfung gelangten 0,05 und 0,1 ml Metherginlösung auf einem Rundfilter von 16 cm Ø (Schleicher & Schüll 2045 b) zur Anwendung. Nach Entwickeln des Chromatogrammes in einer Petrischale von 15 cm Ø und 2 cm Höhe mit Butanol-Eisessig-Wasser-Gemisch (4:1:5) fluoreszierte Methylergobasin im ultravioletten Licht mit einem RF-Wert von 0,80 leuchtend blau.

Papierchromatographie von Agroclavin (Methylergolin).

0,1 ml einer 0,5 %igen Lösung - als "Secalamin" (K 934) im Handel - wurden auf ein Rundfilter von 16 cm $\varnothing$ (Schleicher & Schüll 2045 b) aufgetropft und in einer Petrischale von 15 cm $\varnothing$ und 2 cm Höhe mit 170 ml Butanol-Eisessig-Wasser-Gemisch im Verhältnis 4:1:5 entwickelt. Nach dem Trocknen zeigte sich im ultravioletten Licht ein blau fluoreszierender Ring mit RF 0,84 ein zweiter Ring mit RF 0,51 fluoreszierte gelbgrün (Ascorbinsäure?).

Haltbarkeit flüssiger Ergometrinzubereitungen
bei Zimmertemperatur.

a) Ergometrin in wässrigen Lösungen:

Zur Prüfung wässriger Ergometrinlösungen wurden solche des Alkaloids mit den folgenden Säuren und Basen hergestellt:

0,3 mol Schwefelsäure	destilliertem Wasser
0,3 mol Phosphorsäure	0,3 mol Natriumbikarbonatlösung
0,3 mol Weinsäure	0,3 mol Natriumkarbonatlösung
30 %ige Weinsäure	1 mol Ammoniak
0,5 mol Essigsäure	0,5 mol Natronlauge
Eisessig	

10 mg reinstes Ergometrin wurden genau gewogen und in einem 10 ml Meßkölbchen mit den Solventien aufgefüllt. Die Lösungen lagerten in weißen Glasstöpselfläschchen bei Zimmertemperatur. Nach genau festgelegtem Untersuchungsplan wurden nach

5 - 10 - 15 - 20 - 30 - 45 - 60 Minuten,
1 1/2 - 2 - 3 - 4 - 5 - 7 - 10 - 15 - 20 - 24 Stunden,
1 1/2 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 8 - 10 - 12 - 15 - 18 -
21 - 24 - 28 - 31 Tagen

0,05 ml aus den einzelnen Lösungen mit Blutzuckerpipetten entnommen und auf Rundfilter von 16 cm $\varnothing$ (Schleicher & Schüll 2045 b) aufgetragen. Vom Filterrand zum Mittelpunkt wurde in

der Faserrichtung ein 8 mm breiter Docht eingeschnitten und dieser nach Verkürzen auf eine Länge von 3 cm nach unten umgeknickt. Die einzelnen Chromatogramme wurden in Petrischalen von 15 cm Ø und 2 cm Höhe, welche mit 170 ml eines Gemisches von Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) beschickt waren, entwickelt. Innerhalb von 4 Stunden waren die einzelnen Zonen genügend weit aufgetrennt. Die Papierchromatogramme wurden an einem dunklen Ort getrocknet und die RF-Werte nach Betrachter unter ultraviolettem Licht ausgerechnet. Ergometrin mit RF 0. und Ergometrinin mit RF 0,79 fluoreszierten blau, ebenso die Verseifungsprodukte mit RF 0,58 (Lysergsaureamid?) und RF 0,1 (Lysergsäure). Gelblich fluoreszierte α -Aminopropanol mit RF 0,33 und gelbgrün ein Oxydationsprodukt des Alkaloids mit RF 0,90. Die Einzelergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle zusammengefaßt.

Ergometrin bei 20° in	Umlagerung nach	Verseifung nach	Oxydation nach
Schwefelsäure 2,9 %ig	0*)	24 Stunden	21 Tagen
Phosphorsäure 2,9 %ig	0	2 Tagen	21 Tagen
Weinsäure 4,5 %ig	0	14 Tagen	21 Tagen
Weinsäure 30 %ig	0	19 Tagen	21 Tagen
Essigsäure 3 %ig	0	14 Tagen	14 Tagen
Eisessig	6 Tagen	13 Tagen	7 Tagen
destilliertem Wasser	8 Tagen	0	7 Tagen
Natriumbikarbonat 2,5 %ig	6 Stunden	0	7 Tagen
Natriumkarbonat 3,2 %ig	4 Stunden	0	7 Tagen
Ammoniak 1,7 %ig	2 Stunden	0	7 Tagen
Natronlauge 2 %ig	sofort	10 Tagen	7 Tagen

Tabelle 17

*) 0 = während der Versuchsdauer negativ
(gilt für alle Tabellen)

b) Ergometrin in Pufferlösungen:

Je 10 mg genau gewogenes reinstes Ergometrin wurden in 10 ml Meßkölbchen in Pufferlösungen mit verschiedenen PH-Werten gelöst. Zur Anwendung gelangten für:

- PH 1 bis 4,5 : Citrat-Salzsäurepuffer nach "Sörensen"
 PH 5 und 6 : Citrat-Natronlaugepuffer nach "Sörensen"
 PH 7 und 8 : Citrat-Phosphatpuffer nach "Mc.Ilvaine"
 PH 9 bis 13 : Glykokoll-Natronlaugepuffer nach "Sörensen".

Die Lösungen wurden bei Zimmertemperatur in weißen Glasstöpselfläschchen gelagert und wie oben beschrieben papierchromatographisch untersucht. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 18.

Ergometrin in Pufferlösung	Umlagerung nach	Verseifung nach	Oxydation nach
PH 1	0	2 Stunden	0
PH 2	0	10 Tagen	Spur 28 Tagen
PH 3	0	20 Tagen	Spur 21 Tagen
PH 4	0	0	Spur 21 Tagen
PH 4,5	0	0	Spur 21 Tagen
PH 5	0	0	Spur 21 Tagen
PH 6	12 Tagen	0	Spur 21 Tagen
PH 7	24 Stunden	0	Spur 21 Tagen
PH 8	24 Stunden	0	Spur 21 Tagen
PH 9	12 Stunden	0	Spur 21 Tagen
PH 10	12 Stunden	0	Spur 21 Tagen
PH 11	12 Stunden	Spur 21 Tagen	Spur 21 Tagen
PH 12	6 Stunden	Spur 21 Tagen	Spur 21 Tagen
PH 13	15 Minuten	6 Tagen	14 Tagen

Tabelle 18

c) Ergometrin in organischen Lösungsmitteln:

Die für die Untersuchung benötigten Alkaloidlösungen wurden durch Versetzen von 10 mg feinst verriebenem Ergometrin mit je 10 ml Methanol, Äthanol 90 %ig und 50 %ig bereitet. In Äther, Azeton, Methylenchlorid, Chloroform, Essigester und Benzol ging die Base nicht klar in Lösung, ein kleiner Teil des Kristallpulvers blieb als Bodensatz ungelöst. Mit Ausnahme der alkoholischen Lösungen, welche genau nach obigem Untersuchungsplan überprüft wurden, erfolgte bei den restlichen Lösungen die Entnahme der Proben zuerst alle 2 Tage, nach 2-wöchiger Lagerung nur noch alle 5 Tage. Tabelle 19 zeigt die Einzelheiten der Versuchsergebnisse.

Ergometrin in	Umlagerung nach	Verseifung nach	Oxydation nach
Methanol	2 Tagen	0	0
Äthanol 90 %ig	3 Tagen	0	0
Äthanol 50 %ig	3 Tagen	0	0
Äther	0	0	0
Azeton	0	0	0
Methylenchlorid	0	0	0
Chloroform	0	0	0
Benzol	0	0	0
Essigsäureäthylester	0	0	0

Tabelle 19

Haltbarkeit flüssiger Ergometrinzubereitungen
bei erhöhter Temperatur.

a) Ergometrin in wässrigen Lösungen:

In Spezialsterilisationsfläschchen mit 20 ccm Inhalt (Hersteller Firma Braun, Melsungen) wurden 10 mg analysenreines Ergometrin genau eingewogen und mit 10 ml des jeweils zu überprüfenden Lösungsmittels versetzt. Die Lagerung erfolgte unter

Konstanthaltung der Temperatur im Thermostat bei 50° C und teilweise bei 100° C. Zur papierchromatographischen Untersuchung wurden nach 20 - 30 - 45 - 60 Minuten, 1 1/2 - 2 - 3 - 6 - 12 und 24 Stunden, sowie nach 1 1/2 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 8 und 11 Tagen Proben entnommen und davon 0,05 ml mit Blutzuckerpipetten auf Rundfilter (Schleicher & Schüll 2045 b, 16 cm Ø) aufgetropft. Nach Entwickeln der Chromatogramme in Petrischalen von 15 cm Ø und 2 cm Höhe mit 170 ml Elutionsmittel Butanol-Eisessig-Wasser-Gemisch 4:1:5 wurden die Chromatogramme im ultravioletten Licht ausgewertet. Die Einzelheiten der Ergebnisse sind in Tabelle 20 zusammengestellt.

Ergometrin bei 50° in	Umlagerung nach	Verseifung nach	Oxydation nach
Weinsäure 4,5 %ig	6 Tagen	6 Tagen	0
Essigsäure 3 %ig	7 Tagen	11 Tagen	0
Pufferlösung PH 3	7 Tagen	0	0
Pufferlösung PH 4	4 Tagen	0	0
Pufferlösung PH 4,5	3 Tagen	0	0
destilliertem Wasser	10 Stunden	8 Tagen	8 Tagen
Natriumbikarbonat 2,5 %ig	45 Minuten	6 Tagen	2 Tagen
Ammoniak 1,7 %ig	30 Minuten	6 Tagen	1 Tag
Pufferlösung PH 8	45 Minuten	6 Tagen	?
Ergometrin bei 100° in (Lösungen nach 2 Tagen schwarz)			
Weinsäure 4,5 %ig	3 Stunden	2 Stunden	0
Essigsäure 3 %ig	3 Stunden	24 Stunden	0
destilliertem Wasser	90 Minuten	2 Tagen	Spur 2 Tagen

Tabelle 20

b) Ergometrin in organischen Lösungsmitteln:

25 mg reinstes Ergometrin wurden genau gewogen und in 50 ml Weithalsschliffkölbchen mit je 25 ml Methanol, Äthanol 90 %ig, Äther, Azeton und Benzol versetzt. Die Lösungen wurden unter

Rückflußkühlung im Thermostat eine Woche lang auf Siedetemperatur des betreffenden Lösungsmittels gehalten. Die Entnahme der Untersuchungsproben erfolgte nach 30 - 60 und 90 Minuten. Ferner nach 2 - 3 - 4 - 6 - 8 - 12 - 16 - 24 und 36 Stunden, sowie nach 2 - 3 - 4 - 5 - 6 und 8 Tagen. Dazu wurden 0,05 ml mit Blutzuckerpipetten auf 16 cm-Rundfilter (Schleicher & Schüll 2045 b) aufgetragen und die Chromatogramme in Petrischalen mit Butanol-Eisessig-Wasser-Gemisch (4:1:5) entwickelt. Nach dem Trocknen erfolgte die Auswertung durch Betrachten unter ultraviolettem Licht. Das Erkennen der ersten Wertminde-
rungen zeigt Tabelle 21.

Ergometrin bei Siedetemperatur	Umlagerung nach	Verseifung nach	Oxydation nach
Methanol	3 Stunden	0	0
Äthanol 90 %ig	4 Stunden	0	0
Azeton	Spur 6 Tagen	0	0
Äther	0	0	Spur 8 Tagen
Benzol	0	0	0

Tabelle 21

Untersuchung wässriger Ergometrinlösungen
mit Ascorbinsäurezusatz.

Durch Lösen von 10 mg analysenreinem Ergometrin mit 100 mg bzw. 150 mg Acidum ascorbicum "Merck" in 10 ml Citrat-Salzsäurepuffer PH 4,5 nach "Sörensen" und in 10 ml Citrat-Phosphatpuffer PH 7 nach "Mc.Ilvaine" wurden 0,1 %ige Alkaloidlösungen mit einem Ascorbinsäuregehalt von 1 % bzw. 1,5 % erhalten. Die Lagerung erfolgte in weißen Glasstöpselfläschchen bei Zimmertemperatur. Nach dem auf Seite 57 aufgezeichneten Schema wurde die Alkaloidproben zur Untersuchung entnommen und auf 16 cm-Rundfilter (Schleicher & Schüll 2045 b) aufgetropft. Nach dem Entwickeln in Petrischalen mit Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5)

fluoreszierte unter ultravioletter Bestrahlung neben den blauen Alkaloidringen mit RF 0,69 und RF 0,79 ein breiter Ring mit RF 0,50 stark gelbgrün (Ascorbinsäure). Der Einfluß der Ascorbinsäure auf die Haltbarkeit der Alkaloide ist in Tabelle 22 wiedergegeben.

Ergometrin in	Umlagerung nach	Verseifung nach	Oxydation nach
Pufferlösung PH 4,5 + 1,5 % Ascorbinsäure	Spur 28 Tagen	0	0
Pufferlösung PH 7 + 1 % Ascorbinsäure	24 Stunden	0	Spur 56 Tagen
Pufferlösung PH 7 + 1,5 % Ascorbinsäure	24 Stunden	0	0

Tabelle 22

Trennung der Alkaloide Ergotamin und Ergotaminin
auf dem "Segmentchromatogramm".

a) Bereitung des "Ergotamin-Trennungsgemisches":

21 g Zitronensäure wurden unter Zusatz von 200 ml n-Natronlauge in einem 1000 ml Meßkolben mit frisch destilliertem Wasser gelöst. 684 ml dieser Natriumcitratpufferlösung wurden mit 266 ml n/10-Salzsäure und 50 ml einer Mischung von Azeton und Essigester zu gleichen Teilen durch kräftiges Schütteln innig gemischt. Das so erhaltene Elutionsmittel wurde als "Ergotamin-Trennungsgemisch" bezeichnet.

b) Herstellung der "Segmentchromatogramme":

Zur Bestimmung der Faserrichtung des Papieres wurden auf Filterpapierbögen Nr. 63 der Fa. Macherey & Nagel (58 x 58 cm) in der Nähe des Randes einige Tropfen Wasser aufgetragen. Die Tropfen breiteten sich in Form einer Ellipse aus, deren große Halbachse die Laufrichtung des Papieres anzeigte. Aus den Bögen

wurden, unter Berücksichtigung der Laufrichtung Rundfilter mit 16 cm $\varnothing$ und einem in der Faserrichtung verlaufenden, 8 mm breiten und 3 cm langen Docht geschnitten. Um den Filtermittelpunkt wurde ein Kreis mit 1 cm Halbmesser als "Startlinie" gezogen und der Docht nach unten umgeknickt. Auf dieser wurden an genau bezeichneten Stellen mit einer Blutzuckerpipette abnehmende Mengen einer 0,02 %igen methanolischen Ergotaminlösung, sowie einer ebensolchen Ergotamininlösung aufgetragen. Die Chromatogramme wurden zum Entwickeln auf Petrischalen von 15 cm $\varnothing$ und 2 cm Höhe gelegt, welche 170 ml "Ergotamin-Trennungsgemisch" enthielten. Sie waren zur Vermeidung der leichten Verdunstung des organischen Lösungsmittelzusatzes mit den umgekehrten Deckeln der Petrischalen beschwert. Nach 2 1/2 Stunden hatten sich die Chromatogramme bis nahe an den Filterrand mit Lösungsmittel vollgesogen. Sie wurden in noch feuchtem Zustand mit ultraviolettem Licht bestrahlt und die Lage der einzelnen Segmente markiert. Durch Division der Entfernung Startlinie - Substanzfleck durch die Entfernung Startlinie - Lösungsmittelfront wurden die RF-Werte der beiden Alkaloide ermittelt. Ergotamin fluoreszierte als bläulich-weißes Kreissegment mit RF $0,45 \pm 0,02$ und Ergotaminin als ein ebensolches mit RF $0,56 \pm 0,02$. Die auf dem "Segmentchromatogramm" eben noch erkennbare kleinste Alkaloidmenge betrug bei den beiden Isomeren 2 μ .

Papierchromatographische Trennung eines Gemisches von Ergotamin und Ergotaminin.

Von analysenreinem Ergotamin (als Ergotamin-Azeton-Wasser-Kristallisat) und Ergotaminin wurden 0,1 %ige Lösungen in Methanol und Methylenchlorid bereitet und durch Vermischen eine Verdünnungsreihe derart hergestellt, daß in einem ml Alkaloidlösung jeweils abnehmende Ergotamininmengen enthalten waren. 0,05 ml dieser Lösungen wurden mit Blutzuckerpipetten entnommen und darauf "Segmentchromatogramme" angesetzt. Die Entwicklung erfolgte in Petrischalen von 15 cm $\varnothing$ und 2 cm Höhe mit 170 ml "Ergotamin-Trennungsgemisch". Nach 2 Stunden war die Elution beendet, die

Chromatogramme wurden unter ultraviolettem Licht ausgewertet. Die Ergebnisse der einzelnen Chromatogramme sind in Tabelle 23 zusammengestellt. Beim Chromatographieren von 50 μ Alkaloidgemisch nach der "Segmentmethode" konnten 2 - 3 μ Ergotaminin neben 47 bzw. 48 μ Ergotamin eben noch erkannt werden, dies sind 5 %.

Ergotamin + Ergotaminin		Ergotaminin
40,0 μ	10,0 μ	gut erkennbar
42,5 μ	7,5 μ	gut erkennbar
44,0 μ	6,0 μ	gut erkennbar
45,0 μ	5,0 μ	gut erkennbar
45,5 μ	4,5 μ	gut erkennbar
46,0 μ	4,0 μ	gut erkennbar
46,5 μ	3,5 μ	noch erkennbar
47,0 μ	3,0 μ	noch erkennbar
47,5 μ	2,5 μ	Spuren erkennbar
48,0 μ	2,0 μ	0
48,5 μ	1,5 μ	0
49,0 μ	1,0 μ	0

Tabelle 23

Papierchromatographische Auftrennung von Sensibamin.

10 mg Sensibamin wurden in einem 10 ml Meßkölbchen in Methylchlorid gelöst und mit einer Blutzuckerpipette von dieser Lösung 0,05 ml tropfenweise auf ein "Segmentchromatogramm" zur Verdunstung gebracht. Als Vergleichssubstanzen wurden 0,025 ml einer 0,1 %igen Ergotamin- und Ergotamininlösung mit auf das Chromatogramm getropft. In Petrischalen von 15 cm $\varnothing$ und 2 cm Höhe wurde das Chromatogramm mit 170 ml "Ergotamin-Trennungsgemisch" entwickelt. Nach 2 Stunden war Sensibamin in zwei bananenförmige Segmente getrennt, welche unter der U.V.-Lampe

leuchtend blau fluoreszierten. Sie stimmten sowohl in ihren RF-Werten als auch in der Intensität der Fluoreszenz mit den Sektoren der Testsubstanzen Ergotamin und Ergotaminin überein.

Papierchromatographie von "Gynergen" Ampullen und Lösung.

Mit Blutzuckerpipetten wurden 0,025 ml "Gynergen"-Tropflösung (entsprechend 25 μ Ergotamintartrat) und 0,05 ml "Gynergen"-Injektionslösung (entsprechend 25 μ Ergotamintartrat) auf ein "Segmentchromatogramm" aufgetropft. Als Vergleichssubstanzen dienten 0,025 ml einer 0,1 %igen Lösung von Ergotamin und Ergotaminin in Methylenchlorid. Das Chromatogramm wurde in einer Petrischale von 15 cm $\varnothing$ und 2 cm Höhe mit 170 ml "Ergotamin-Trennungsgemisch" entwickelt. Beim Bestrahlen des entwickelten Chromatogrammes mit ultravioletem Licht zeigten beide "Gynerge"-Präparate neben Ergotamin deutlich Ergotaminin. Auf Grund der Fluoreszenzintensität wurde der Ergotaminanteil auf ca 20 % geschätzt.

Papierchromatographie von "Bellergal"-Dragees.

Zur Extraktion der Mutterkornalkaloide (300 μ Ergotamintartrat pro Dosi) wurden 2 Dragees in einem Reagensglas mit 1 ml 70 %igem Methanol, dem 1 % Weinsäure zugesetzt war versetzt. Nach öfterem Umrühren mit einem Glasstab innerhalb einer Stunde wurde vom Ungelösten abfiltriert und 0,05 ml des klaren Filtrates mit einer Blutzuckerpipette auf ein "Segmentchromatogramm" aufgetragen. Als Vergleichssubstanzen gelangten je 25 μ Ergotamin und Ergotaminin aus Methylenchloridlösungen mit auf das Chromatogramm. Nach Entwickeln mit "Ergotamin-Trennungsgemisch" nach der Rutter-Technik konnte das aus den Dragees isolierte Mutterkornalkaloid durch Vergleich mit den Testsubstanzen als Ergotamin identifiziert werden. Ergotaminin war nicht nachzuweisen.

Haltbarkeit flüssiger Ergotaminzubereitungen
bei Zimmertemperatur.

a) Ergotamin in wässrigen Flüssigkeiten:

Die für die Untersuchungen benötigten Alkaloidlösungen wurden durch Versetzen von je 10 mg analysenreinem Ergotamin-tartrat mit 10 ml der folgenden Flüssigkeiten bereitet:

1 mol Salzsäure	Eisessig
0,3 mol Schwefelsäure	destilliertem Wasser
0,3 mol Phosphorsäure	0,3 mol Natriumbikarbonatlösung
0,3 mol Weinsäure	0,3 mol Natriumkarbonatlösung
30 %iger Weinsäure	1 mol Ammoniak
0,5 mol Essigsäure	0,5 mol Natronlauge.

Ferner wurden 0,1 %ige Lösungen des Alkaloids in verschiedenen Pufferlösungen hergestellt:

PH 1 bis 4,5	: Citrat-Salzsäurepuffer nach "Sörensen"
PH 5 und 6	: Citrat-Natronlaugepuffer nach "Sörensen"
PH 7 und 8	: Citrat-Phosphatpuffer nach "Mc.Ilvaine"
PH 9 bis 13	: Glykokoll-Natronlaugepuffer "Sörensen".

Ergotamintartrat ging vor allem in alkalischem Milieu nicht völlig klar in Lösung, ein Teil der Base blieb als feinflockiger Niederschlag ungelöst. Die Lösungen wurden in weißen Glasstöpselfläschchen bei Zimmertemperatur gelagert und nach

5 - 10 - 15 - 20 - 30 - 45 - 60 - 90 Minuten,
2 - 3 - 4 - 5 - 7 - 10 - 15 - 20 - 24 - 36 Stunden,
2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 8 - 10 - 12 - 14 - 18 -
21 - 24 - 28 - 31 Tagen

papierchromatographisch auf Wertminderung geprüft.

Prüfung auf Spaltungs- und Verseifungsprodukte:

0,05 ml der zu untersuchenden Lösungen wurden mit Blutzuckerpipetten auf Rundfilter von 16 cm $\varnothing$ Schleicher & Schüll 2045 b) aufgetropft. Die Chromatogramme wurden nach Einschnei-

den eines 8 mm breiten und 3 cm langen Dochtes in der Faser-
richtung in Petrischalen von 15 cm $\varnothing$ und 2 cm Höhe mit 170 ml
Butanol-Eisessig-Wasser-Gemisch (4:1:5) entwickelt. Innerhalb
von 4 Stunden waren die Substanzen genügend weit aufgetrennt.
Die Chromatogramme wurden getrocknet und durch Bestrahlen mit
ultraviolettem Licht die Lage der verschiedenen Ringe sicht-
bar gemacht. Die einzelnen RF-Werte sind in Tabelle 24 zusam-
mengestellt.

RF-Wert	Fluoreszenz im U.V.-Licht	Substanz
0,96	bläulich-weiß	Ergotamin Ergotaminin
0,90	gelblich	Oxydationsprodukt
0,64	gelbgrün	Phenylalanin
0,58	blau	Verseifungsprodukt (Ergin-Isoergin)
0,51	blau	Verseifungsprodukt (Lysergsäure)
0,42	gelbgrün	Verseifungsprodukt (Diketopiperazin)
0,34	rotbraun	Prolin

Tabelle 24

Prüfung auf Ergotaminin:

Mit Blutzuckerpipetten wurden 0,05 ml der zu überprüfenden
Lösungen und Vergleichslösungen von Ergotamin und Ergotaminin
an genau bezeichneten Stellen der "Startlinie" der "Segment-
chromatogramme" aufgetragen. In der Faserrichtung wurde ein
Docht von 8 mm Breite und 3 cm Länge eingeschnitten und die
Chromatogramme in Petrischalen von 15 cm $\varnothing$ und 2 cm Höhe mit
170 ml "Ergotamin-Trennungsgemisch" entwickelt. Nach einer
Laufzeit von 2 Stunden waren die Alkaloide genügend weit auf-

getrennt und die Chromatogramme wurden in noch feuchtem Zustand unter ultravioletttem Licht betrachtet, wobei die Ergotamin- und Ergotamininflecken durch Vergleich mit den "Testsektoren" als solche identifiziert werden konnten. Die Einzelheiten der chromatographischen Untersuchungen zeigt Tabelle 25.

Ergotamintartrat bei 20° in	Umlagerung nach	Spaltung anschließend Verseifg.nach	Farbe nach 4 Wochen
Salzsäure 3,65 %ig	0	14 Tagen	blaßrosa
Schwefelsäure 2,9 %ig	0	14 Tagen	graubraun
Phosphorsäure 2,9 %ig	0	14 Tagen	graublau
Weinsäure 4,5 %ig	20 Tagen	0	graugrün
Weinsäure 30 %ig	21 Tagen	0	graugrün
Essigsäure 3 %ig	5 Tagen	0	graugrün
Eisessig	3 Stunden	0	nach 7 Tg. dkl.braun
destilliertem Wasser	5 Tagen	0	grau
Natr.Bikarbonat 2,5 %ig	0	0	0
Natr.Karbonat 3,2 %ig	0	0	0
Ammoniak 1,7 %ig	0	0	0
Natronlauge 2,0 %ig	sofort	5 Stunden	nach 4 Tg. dkl.braun
Pufferlösung PH 1,0	0	18 Tagen	graugrün
Pufferlösung PH 2,0	Spur 56 Tagen	Spur 56 Tagen	farblos
Pufferlösung PH 3,0	18 Tagen	0	graugrün
Pufferlösung PH 4,0	3 Tagen	0	graugrün
Pufferlösung PH 4,5	24 Stunden	0	graugrün
Pufferlösung PH 5,0	20 Stunden	0	grau
Pufferlösung PH 6,0	Spur 8 Tagen	0	grau
Pufferlösung PH 7,0	0	0	grau
Pufferlösung PH 8,0	0	0	gelbbraun
Pufferlösung PH 9,0	0	0	gelbbraun
Pufferlösung PH 10,0	0	0	gelbbraun
Pufferlösung PH 11,0	0	0	gelbbraun
Pufferlösung PH 12,0	0	0	gelbbraun
Pufferlösung PH 13,0	4 Stunden	12 Stunden	nach 6 Tg. dkl.braun

b) Ergotamin in organischen Lösungsmitteln:

Mit den folgenden Lösungsmitteln wurden 0,1 %ige Lösungen der Ergotamin-Azeton-Wasser-Verbindung hergestellt und bei Zimmertemperatur in weissen Glasstöpseliläschen gelagert:

Methanol	Methylenchlorid
Äthanol 90 %ig	Chloroform
Äthanol 50 %ig	Äther
Butanol	Azeton
Benzol	Essigester.

Aus den vier alkoholischen Lösungen wurden die Proben nach oben beschriebenem Schema entnommen. Die Überprüfung der restlichen Solutionen erfolgte alle 2 Tage und nach Beginn der 3. Lagerungswoche nur noch alle 5 Tage.

Im Einzelnen wurden 0,05 ml der zu untersuchenden Lösungen mit Blutzuckerpipetten zur Prüfung auf Spalt- und Verseifungsprodukte auf Rundfilter von 16 cm Ø (Schleicher & Schüll 2045 b) aufgetropft und diese in Petrischalen von 15 cm Ø und 2 cm Höhe mit 170 ml Butanol-Eisessig-Wasser-Gemisch (4:1:5) entwickelt. Nach 4 Stunden wurden die Chromatogramme getrocknet und daraufhin unter ultravioletterm Licht ausgewertet.

Zur Prüfung auf Ergotaminin wurden 0,05 ml der Alkaloidlösungen auf "Segmentenchromatogramme" aufgetragen und zusammen mit Testlösungen von Ergotamin und Ergotaminin in Petrischalen von 15 cm Ø und 2 cm Höhe mit 170 ml "Ergotamin-Trennungsgemisch" entwickelt. Nach 2 Stunden Laufzeit wurden die Segmente der Testlösungen mit den Alkaloidsektoren in noch feuchtem Zustand unter der U.V.-Lampe verglichen. In Tabelle 26 ist der eben erkennbare Beginn der Verminderung in den einzelnen Lösungen zusammengefaßt, wobei die Farbe der Lösungen mitberücksichtigt wurde. Das Oxydationsprodukt mit RF 0,90 konnte in keinem Fall nachgewiesen werden.

Ergotamin bei 20° in	Umlagerung nach	Spaltung anschließend Verseifg.nach	Farbe nach 4 Wochen
Methanol	15 Stunden	0	gelbbraun
Äthanol 90 %ig	48 Stunden	Spur 21 Tg. ?	tief grün
Äthanol 50 %ig	60 Stunden	0	tief grün
Butanol	5 Tagen	0	tief grün
Methylenchlorid	0	0	graubraun
Äther	0	0	farblos
Azeton	0	0	gelbbraun
Chloroform	0	0	graubraun
Essigsäureäthylester	0	0	hellgrau
Benzol	0	0	farblos

Tabelle 26

Haltbarkeit flüssiger Ergotaminzubereitungen
bei erhöhter Temperatur.

a) Ergotamin in wässrigen Lösungen:

10 ml einer 0,1 %igen Lösung von Ergotamintartrat in

0,3 mol Phosphorsäure	0,3 mol Natriumbikarbonatlösung
0,3 mol Weinsäure	1 mol Ammoniak
30 %iger Weinsäure	Pufferlösung PH 1,0
0,5 mol Essigsäure	Pufferlösung PH 7,0
destilliertem Wasser	Pufferlösung PH 9,0

wurden in 20 ccm Spezialsterilisationsfläschchen der Fa. Braun, Melsungen im Thermostat 10 Tage lang auf 50° C bzw. während 3 Tagen auf 100° C konstant gehalten. Die papierchromatographische Untersuchung der Alkaloidlösungen erfolgte jeweils nach 30 - 60 und 90 Minuten, sowie nach 2 - 3 - 4 - 6 - 8 - 12 - 16 - 20 - 24 - 36 und 48 Stunden.

0,05 ml der Untersuchungslösungen wurden mit Blutzuckerpipetten entnommen, auf Kundfilter von 16 cm Ø (Schleicher & Schüll 2045 b) getropft und zur Prüfung auf Spalt- bzw. Ver-

seifungsprodukte in Petrischalen von 15 cm $\varnothing$ und 2 cm Höhe nach der "Rutter-Technik" mit 170 ml Butanol-Eisessig-Wasser-Gemisch (4:1:5) entwickelt. Nach dem Trocknen wurden die Chromatogramme unter ultravioletttem Licht ausgewertet.

Zur Prüfung auf Ergotaminin wurden 0,05 ml der zu untersuchenden Flüssigkeiten in Verbindung mit Testlösungen von Ergotamin und Ergotaminin auf "Segmentchromatogramme" getropft. Die Entwicklung erfolgte in Petrischalen von 15 cm $\varnothing$ und 2 cm Höhe mit 170 ml "Ergotamin-Trennungsgemisch". Nach 2 Stunden Laufzeit wurden die Chromatogramme in noch feuchtem Zustand unter der U.V.-Lampe ausgewertet. Ergotamin und Ergotaminin konnten durch Vergleich mit den "Testsektoren" erkannt werden während die Verseifungsprodukte mit höheren RF-Werten etwas verwaschene Zonen bildeten. Auf Grund der verschiedenen starken Fluoreszenz der Segmente wurde die Wertminderung grob geschätzt. Im Einzelnen zeigten die Chromatogramme folgende Bilder:

Lagerung in 4,5 %iger Weinsäure bei 50° C:

Erste Spuren von Ergotaminin waren nach 12 Stunden nachgewiesen. Rasche Zunahme des Umlagerungsproduktes, bis es nach 1 1/2 Tagen ca 50 % erreicht hat. Dann keine merkliche Zunahme mehr. Langsamer Beginn der Alkaloidspaltung wurde nach 8 Tagen beobachtet. Farbe der Lösung grünschwarz.

Haltbarkeit in 3 %iger Essigsäure bei 50° C:

Beginn der Umlagerung konnte nach 12 Stunden nachgewiesen werden. Rasche Zunahme des Ergotaminins, welches nach 24 Stunden bereits 50 % erreicht hat. Dann keine weitere Zunahme mehr erkennbar. Produkte der Alkaloidspaltung traten nach 10 Tagen auf. Farbe der Lösung gelbgrün.

Haltbarkeit in destilliertem Wasser bei 50° C:

Erkennen der Umlagerung nach 12 Stunden, aber nur sehr langsam zunehmend. Erst nach 6 Tagen waren etwa gleiche Mengen Ergotaminin und Ergotamin in der Lösung. Nach 10 Tagen schwacher Nachweis der Alkaloidspaltung. Lösung gelb bis grau.

Haltbarkeit in 2,3 %iger Phosphorsäure bei 100° C:

Umlagerung nach 1/2 Stunde erkennbar, erste Spuren der Alkaloidspaltung nach 3 Stunden. Bereits nach 90 Minuten überwog Ergotaminin das Ergotamin, nach 9 Stunden war genuines Ergotamin nur noch in Spuren vorhanden. Deutliche Zunahme der Spaltprodukte, nach 2 Tagen war die Hälfte des Alkaloids verseift. Lösung nach 9 Stunden tief graublau gefärbt, nach 2 Tagen schwarz.

Haltbarkeit in 30 %iger Weinsäure bei 100° C:

Nach 1/2 Stunde Ergotaminin deutlich nachweisbar. Es überwog nach 1 Stunde bereits deutlich das Ergotamin, welches nach 5 Stunden nur noch in Spuren vorhanden war. Erkennen der Alkaloidspaltung nach 3 Stunden, sie vollzog sich wesentlich langsamer als die Umlagerung. Lösung nach 9 Stunden tief blaugrün gefärbt, nach 2 Tagen schwarz.

Haltbarkeit in 4,5 %iger Weinsäure bei 100° C:

Deutliche Umlagerung in der ersten halben Stunde. Rasche Zunahme des Ergotaminins, nach 9 Stunden Ergotamin nur noch in Spuren vorhanden. Nachweis der ersten Spaltprodukte nach 4 Stunden, nach 2 Tagen war die Hälfte des Ergotaminins verseift. Starke Verfärbung der Lösung über graublau bis schwarz.

Haltbarkeit in 3 %iger Essigsäure bei 100° C:

Beginn der Umlagerung innerhalb einer Stunde, nach 9 Stunden war fast alles Ergotamin isomerisiert. Dann langsames Auftreten der Spaltprodukte, welche nicht rasch zunahmen. Verfärbung der Lösung von hellgrün bis schwarz innerhalb von 2 Tagen.

Haltbarkeit in destilliertem Wasser bei 100° C:

Deutliches Erkennen von Ergotaminin nach 1 1/2 Stunden, welches nach 9 Stunden etwa 50 % erreicht hat. Spuren von Spaltprodukten nach 4 Stunden schwach erkennbar, aber nur langsam weiter ansteigend. Farbe der Lösung anfangs graugrün, später schwarz.

Haltbarkeit in 2,5 %iger Natriumbikarbonatlösung bei 100° C:

Nachweis der ersten Spuren von Alkaloidspaltprodukten nach 2 1/2 Stunden, noch deutlich vor Beginn der Umlagerung. Rasche Zunahme der Hydrolysate, nach 6 Stunden war bereits die Hälfte des Alkaloids aufgespalten. Dabei Farbvertiefung von hell- nach dunkelbraun.

Haltbarkeit in 1,7 %igem Ammoniak bei 100° C:

Erkennen von Spaltprodukten nach 60 Minuten, von Ergotaminin nach 2 Stunden. Spaltung war viel stärker als die Isomerisation nach 4 Stunden war über die Hälfte des Alkaloids abgebaut. Verfärbung der Lösung dunkelbraun, dann schwarz.

Haltbarkeit in Pufferlösung PH 1,0 bei 100° C:

Auftreten der ersten Umlagerungsspuren nach 30 Minuten. Innerhalb von 2 Stunden hatten sich etwa 50 % Ergotaminin gebildet, Ergotamin war nach 6 Stunden nur noch in Spuren erkennbar. Nachweis der Spaltprodukte nach 2 Stunden, nach 1 1/2 Tagen war über die Hälfte des Alkaloids hydrolytisch aufgespalten. Dabei Verfärbung über graublau bis schwarz.

Haltbarkeit in Pufferlösung PH 7,0 bei 100° C:

Erkennen der Alkaloidspaltung nach 3 1/2 Stunden. Sie begann noch vor der Isomerisation und war stärker als diese. Deutliche Zunahme der Hydrolysate unter Farbvertiefung der Lösung über hellgrau bis schwarzbraun.

Haltbarkeit in Pufferlösung PH 9,0 bei 100° C:

Nachweis der ersten Spaltprodukte noch vor Beginn der Isomerisation nach 3 1/2 Stunden. Nur langsame Zunahme von Ergotaminin, die Verseifungsprodukte dagegen stiegen weiter stark an. Farbe der Lösung anfangs hellgrau, nach 2 Tagen schwarzbraun.

b) Ergotamin in organischen Lösungsmitteln:

25 mg Ergotamin (als Ergotamin-Azeton-Wasser-Kristallisat) wurden in 50 ccm Weithalsschliffkölbchen in jeweils 25 ml Methanol, Azeton, Methylenchlorid und Benzol gelöst und unter Rückflußkühlung 6 Tage lang im Thermostat auf Siedetemperatur des jeweiligen Lösungsmittels gehalten. Die papierchromatographische Überprüfung der Lösungen erfolgte nach 30 - 60 - 90 Minuten, sowie nach 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 8 - 10 - 12 - 15 - 20 - 24 - 36 und 48 Stunden.

Für die Prüfung auf Spaltungs- bzw. Verseifungsprodukte des Alkaloids wurden 0,05 ml Alkaloidlösung mit Blutzuckerpipetten auf Rundfilter von 16 cm Ø (Schleicher & Schüll 2045 b) getropft und in Petrischalen von 15 cm Ø und 2 cm Höhe mit 170 ml Butanol-Eisessig-Wasser-Gemisch (4:1:5) entwickelt. Nach 4 Stunden wurden die Chromatogramme getrocknet und daraufhin unter ultraviolettem Licht ausgewertet.

Auf Ergotaminin wurde geprüft durch Auftropfen von 0,05 ml Untersuchungslösung auf "Segmentchromatogramme" und einer Vergleichslösung von Ergotamin und Ergotaminin. Die Chromatogramme wurden in Petrischalen von 15 cm Ø und 2 cm Höhe mit 170 ml "Ergotamin-Trennungsgemisch" entwickelt. Die Chromatogramme wurden nach 2 Stunden in noch feuchtem Zustand unter der U.V.-Lampe betrachtet und die Alkaloidsegmente durch Vergleich mit den "Testsektoren" identifiziert. Die Untersuchungsergebnisse zeigt Tabelle 27.

Ergotamin beim Siedepunkt in	Umlagerung nach	Spaltung anschließend Verseifg.nach	Farbe nach 2 Tagen
Methanol	10 Minuten	0	graugrün
Azeton	15 Stunden	0	grau
Benzol	0	0	grau
Methylenchlorid	0	0	grau

Tabelle 27

Ergotamin-Umlagerung in alkalischem Milieu bei 20°.

a) Ergotamin in alkalischer Lösung:

10 mg Ergotamintartrat wurden in weißen Glasstöpselfläschchen mit je 10 ml Glykokoll-Natronlaugepuffer PH 9 nach "Sörensen" und 10 ml einer 3,2 %igen Natriumkarbonatlösung versetzt und bei Zimmertemperatur aufbewahrt. In beiden Fläschchen blieb ein Teil des Alkaloids ungelöst, die Base setzte sich als feinflockiger Niederschlag ab. Von der Natriumkarbonatlösung wurde nach 4 Wochen, von der Pufferlösung nach 4 Monaten das leicht grau gefärbte Sediment abzentrifugiert und in 4 ml Methylenchlorid gelöst. Nach 1/2-stündigem Trocknen mit geglühtem Natriumsulfat wurden die klaren Lösungen abfiltriert, die Rückstände mit 2 ml Methylenchlorid nachgewaschen und die vereinigten Filtrate auf dem Wasserbad auf ca 2 ml eingengt.

1. Papierchromatographische Untersuchung:

0,1 ml der konzentrierten Methylenchloridlösungen wurden mit 9 ml desselben Lösungsmittels verdünnt und davon mit Blutzuckerpipetten 0,05 ml in Verbindung mit Testlösungen von Ergotamin und Ergotaminin auf "Segmentchromatogramme" von 16 cm Ø (Papier Nr. 63 Macherey & Nagel) aufgetragen. Die Entwicklung der Chromatogramme erfolgte in Petrischalen von 15 cm Ø und 2 cm Höhe mit 170 ml "Ergotamin-Trennungsgemisch". Nach 2 Stunden wurden sie in noch feuchtem Zustand mit ultraviolettem Licht bestrahlt und die RF-Werte der beiden "Sedimentlösungen" als 0,45 ausgerechnet. Sie stimmten somit mit jenen der Ergotamin-Testsubstanz überein, Ergotaminin war nicht nachzuweisen.

2. Kristallbild:

Je ein Tropfen der konzentrierten Methylenchloridlösungen wurden auf einem Objektträger verdunstet und durch Zugabe eines Tropfens 90 %igen Azetons zur Kristallisation gebracht. Das Kristallbild zeigte die typischen Prismen der Ergotamin-Azeton-Wasser-Verbindung. Ergotaminin- und Sensibaminkristalle waren nicht zu erkennen. Mit Hilfe der Kofler-Mikroschmelzpunkts-

apparatur wurde für das Kristallinat ein Schmelzpunkt (Zersetzung) von $180 - 181^{\circ} \text{C}$ gefunden.

3. Säulenchromatographie:

Die restlichen Methylenchloridlösungen wurden auf Aluminiumoxyd-Säulen nach "Brockmann" (angeschlämmt mit Methylenchlorid) von 1 cm $\varnothing$ und 15 cm Länge gegeben. Als Elutionsmittel diente Methylenchlorid mit einem Zusatz von 1 % Äthanol. Das Wandern der Alkaloide wurde durch Bestrahlen der Säulen mit ultraviolettem Licht beobachtet. Die Eluate wurden fraktioniert aufgefangen und von den einzelnen alkaloidhaltigen Fraktionen Kristallbilder angefertigt. In beiden Fällen bildeten sich Ergotamin-Azeton-Wasser-Kristalle aus, welche unter Zersetzung bei 180°C schmolzen. Sensibamin und Ergotaminin waren nicht nachzuweisen.

b) Ergotamin in alkalischer Lösung mit Methanol-Zusatz:

20 mg Ergotamintartrat wurden mit 2 ml Methanol und 8 ml Glykokoll-Natronlaugepuffer PH 11 "Sörensen" versetzt. Ein Teil des Alkaloids fiel dabei als feinflockiger Niederschlag wieder aus. Nach 3-wöchniger Lagerung bei Zimmertemperatur wurde das leicht grau gefärbte Sediment abzentrifugiert.

5 ml der darüberstehenden klaren Lösung wurden 3 mal mit je 10 ml Methylenchlorid ausgeschüttelt. Nach dem Trocknen der organischen Phase mit geglühtem Natriumsulfat wurde filtriert, der Rückstand mit 5 ml Methylenchlorid nachgewaschen und die vereinigten Filtrate auf dem Wasserbad auf ca 1 ml eingeeengt.

Das abzentrifugierte Sediment wurde in 5 ml Methylenchlorid gelöst und 1/2 Stunde mit geglühtem Natriumsulfat getrocknet. Es wurde filtriert und der Rückstand mit 3 ml desselben Lösungsmittels ausgewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden auf dem Wasserbad auf ca 2 ml eingeeengt.

Die beiden konzentrierten Methylenchloridlösungen, sowohl die Ausschüttelung der ursprünglichen Lösung als auch die Lösung des Sediments, wurden nach oben beschriebenen Verfahren

papierchromatographisch, durch Mikrokristallisation und nach Auftrennung über eine Aluminiumoxyd-Säule auf Ergotamin und Ergotaminin geprüft.

1. Papierchromatographie:

Auf dem mit "Ergotamin-Trennungsgemisch" entwickelten "Segmentchromatogramm" konnten aus beiden Lösungen Ergotamin mit RF 0,45 und Ergotaminin mit RF 0,56 durch Vergleich mit Testsubstanzen identifiziert werden.

2. Mikrokristallisation:

Das Kristallbild beider Lösungen zeigte aus 90 %igem Azeton: zahlreiche fünfeckige Ergotamininplatten, während Ergotamin als Azeton-Wasser-Verbindung auskristallisierte.

3. Säulenchromatographie:

Die alkaloidhaltigen Fraktionen von jeweils 0,5 ml wurden einzeln kristallographisch untersucht. Aus 90 %igem Azeton kristallisierte aus Fraktion 1 Sensibamin in langen Prismen, nach einigem Stehen bildeten sich noch dreieckige Ergotamininkristalle. Aus Fraktion 2 wurden ebenfalls Sensibaminkristalle erhalten, während aus Fraktion 3 nach einigem Stehen Ergotamin-Prismen auskristallisierten.

Untersuchung von "Ergotamin liquidum".

Lösung A:	Ergotamintartrat	0,1 g
	Acid. tartaricum	0,1 g
	Spiritus	1,0 g
	Aqua conservans	ad 100,0 ccm.

Lösung B:	Ergotamintartrat	0,1 g
	Acid. tartaricum	0,1 g
	Spiritus	1,0 g
	Glycerinum	15,0 g
	Aqua dest.	ad 100,0 ccm.

0,1 g Ergotamintartrat und 0,1 g Weinsäure wurden in je einem 100 ml Meßkolben mit 1 g Spiritus benetzt und unter gelegentlichem leichtem Umschwenken 3 Minuten stehengelassen. Lösung A wurde mit Aqua conservans, Lösung B nach Zugabe von 15 g Glyzerin mit destilliertem Wasser auf 100 ccm aufgefüllt. Beide Lösungen waren klar und farblos. Sie wurden in braunen Glasstöpselflaschen aufbewahrt und während der ersten 14 Tage täglich, dann im Abstand von 2 Wochen nach folgender Methode papierchromatographisch untersucht:

0,05 ml der Untersuchungslösungen wurden zur Prüfung auf Spaltungs- bzw. Verseifungsprodukte mit Blutzuckerpipetten auf Rundfilter von 16 cm Ø (Schleicher & Schüll 2045 b) aufgetropft. Die Entwicklung erfolgte nach der "Rutter-Technik" in Petrischalen von 15 cm Ø und 2 cm Höhe mit 170 ml Butanol-Eisessig-Wasser-Gemisch (4:1:5). Nach 4 Stunden wurden die Chromatogramme getrocknet und unter ultravioletterem Licht ausgewertet.

Zur Prüfung auf Ergotaminin wurden 0,05 ml der zu untersuchenden Lösungen im Vergleich mit Testlösungen von Ergotamin und Ergotaminin mittels Blutzuckerpipetten auf "Segmentchromatogramme" von 16 cm Ø (Papier Nr. 63 Macherey & Nagel) aufgetragen, und nach der "Rutter-Technik" in Petrischalen von 15 cm Ø und 2 cm Höhe mit 170 ml "Ergotamin-Trennungsgemisch" entwickelt. Nach 2-stündiger Laufzeit wurden die Chromatogramme in noch feuchtem Zustand unter ultravioletterem Licht ausgewertet.

Die quantitative Überprüfung des Alkaloidgehaltes wurde von beiden Lösungen alle 14 Tage durch Messung des "Blauwertes" wiederholt durchgeführt:

1 ml der zu untersuchenden Alkaloidlösungen wurde in einem Erlenmeyerkölbchen von 50 ccm Inhalt mit 19 ml 1 %iger Weinsäure verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden 2 ml in einem Reagensglas mit 4 ml Reagens nach van Urk vermischt. Die Extinktion der entstandenen Blaufärbung wurde nach 15 Minuten in einem elektrischen Photometer (ELKO II von Zeiss-Opton, Filter S 57 E) gemessen und der Alkaloidgehalt aus einer mit reinstem Ergotamin aufgestellten Eichkurve ermittelt.

Berechnung:

$$\text{Ergotamintartrat pro ml} = \frac{\text{abgelesener Wert} \cdot \text{Verdünnung}}{\text{Umrechnungsfaktor}}$$

Beispiel:

abgelesene Lichtdurchlässigkeit: 43,2 %

entsprechend Ergotamin-Base (Eichkurve): 45,5 μ

Umrechnungsfaktor Ergotamin-Base:Tartrat : 0,886

$$\frac{45,5 \cdot 20}{0,886} = 1027 \mu \text{ Ergotamintartrat pro ml.}$$

Die papierchromatographischen Untersuchungen zeigten bei beiden Lösungen die ersten Spuren von Ergotaminin nach 2 1/2 Tagen. Das gebildete Isomere nahm langsam weiter zu, auf Grund der Fluoreszenzintensität wurde der Anteil nach 4 Wochen auf etwa 20 % geschätzt, welcher dann aber annähernd konstant blieb. Innerhalb von 3 Monaten war weder Spaltung bzw. Verseifung noch Oxydation des Alkaloids eingetreten. In beiden Fällen blieben die Lösungen klar und farblos, auch wurde kein Pilzbefall beobachtet.

Die Schwankungen im Alkaloidgehalt sind in Tabelle 28 aufgezeichnet.

Alkaloidgehalt	Lösung A		Lösung B	
	μ /ml	%	μ /ml	%
sofort	1 150	100,0	1 040	100,0
nach 2 Wochen	1 042	91,0	966	93,0
nach 4 Wochen	1 070	93,0	994	95,5
nach 6 Wochen	936 ?	81,5 ?	↓	↓
nach 8 Wochen	1 090	95,0		
nach 10 Wochen	1 060	92,0	↓	↓
nach 12 Wochen	1 986	86,0	985	94,5

Tabelle 28

Untersuchung von Tabletten mit
"Secale concentratum STADA".

Die Zusammensetzung der Tablettenmasse erfolgte in Anlehnung an einen Vorschlag der STADA für "Stadaneurin-Dragees".

Secale conc. STADA	6,0 g
l-Hyoscyamin	0,2 g
Acid.phenylaethylbarbit.	40,0 g
Amylum Solani	16,0 g
Saccharum lactis	27,8 g
Alumin.hydric.colloidal	14,0 g
Pectinum	4,0 g
Talcum	8,0 g
Magnes. stearinicum	4,0 g

Secale concentratum STADA und l-Hyoscyamin wurden mit Phenyl-äthylbarbitursäure zusammen fein verrieben und die Stärke mit Milchzucker gemischt zugegeben. Aluminiumhydroxyd, Pektin, Talk und Magnesiumstearat wurden für sich gemischt, durch Sieb V geschlagen und obiger Verreibung zugesetzt. Die gesamte Tablettenmasse wurde während 4 Stunden in einer Kugelmühle innig vermischt und mit der KOMAGE-Tablettenmaschine (Modell Liliput) zu Preßlingen von etwa 0,7 g "brikettiert". Mit dem Trockengranulator wurden die "Briketts" zerkleinert und nach dem Absieben durch Sieb V die Masse mit einem gewölbten Stempelsatz von 5 mm Ø zu Tablettenkernen von 0,06 g Einzelgewicht gepreßt.

Prüfung der Tabletten.

1. Dosierungsgenauigkeit:

50 Tabletten wurden einzeln auf der Analysenwaage gewogen und daraus nach statistischen Methoden die Dosierungsgenauigkeit errechnet. Sie betrug pro Tablette 58 mg $\pm$ 0,5 %.

2. Zerfallszeit:

Eine Tablette wurde in einem Erlenmeyerkolbchen von 50 ccm Inhalt mit 20 ml Wasser von Zimmertemperatur übergossen und unter öfterem Umschwenken die Zeit bis zum Zerfall der Tablette gestoppt. Aus 20 Einzelprüfungen ergab sich eine durchschnittliche Zerfallszeit von 35 Sekunden.

3. Bestimmung des Alkaloidgehaltes:

Eine Tablette wurde in einem Reagensglas mit 10 ml 20 %iger Weinsäure unter öfterem Umrühren mit einem Glasstab extrahiert. Nach 2 Stunden wurde vom Ungelösten abfiltriert und 2 ml des klaren, farblosen Filtrates mit 4 ml Reagens nach van Urk vermischt. Die Extinktion der entstandenen Blaufärbung wurde nach 15 Minuten in einem elektrischen Photometer (ELKO II von Zeiss-Opton, Filter S 57 E) gemessen und der Alkaloidgehalt aus einer mit reinstem Ergotamin aufgestellten Eichkurve ermittelt.

Aus 20 Einzelanalysen ergab sich ein Mittelwert (statistisch gesichert) von $306,1 \pm 1,1$ Ergotamintartrat.

Beispiel der statistischen Berechnung.

n	f	f ²
264	- 7	49
261	- 10	100
267	- 4	16
270	- 1	1
273	+ 2	4
270	- 1	1
276	+ 5	25
270	- 1	1
273	+ 2	4
273	+ 2	4
270	- 1	1
273	+ 2	4
267	- 4	16
270	- 1	1
267	- 4	16
273	+ 2	4
276	+ 5	25
282	+ 11	121
273	+ 2	4
273	+ 2	4
<u>273</u>	<u>+ 2</u>	<u>4</u>
$\bar{x} = 271$		$f^2 = 401$

$$S = \pm \sqrt{\frac{f^2}{n(n-1)}} = \pm \sqrt{\frac{401}{380}} = \pm \sqrt{1,05} = \pm 1\mu.$$

Alkaloidgehalt pro Tablette: $271\mu \pm 1\mu$ Ergotamin-Base, entsprechend $306\mu \pm 1\mu$ Ergotamintartrat. (Umrechnungsfaktor Ergotamin-Base:Ergotamin-Tartrat = 0,886).

Ergebnisse des Tablettenlagerungsversuches.

Jeder Wert setzt sich aus 20 Einzelanalysen zusammen.

Charge 1: Lagerung unter Vakuum im Kühlschrank:

sofort	306 μ	Ergotamintartrat	=	100,0 %
nach 1 1/2 Mon.	301 μ	" "	=	98,5 %
" 3 "	305 μ	" "	=	99,7 %
" 5 "	295 μ	" "	=	96,5 %
" 6 1/2 "	292 μ	" "	=	95,5 %
" 8 "	288 μ	" "	=	94,0 %
" 1 Jahr.	289 μ	" "	=	94,5 %
" 1 1/2 "	291 μ	" "	=	95,0 %
" 2 "	289 μ	" "	=	94,5 %

Charge 2: Lagerung unter Vakuum bei Zimmertemperatur, hell:

sofort	306 μ	Ergotamintartrat	=	100,0 %
nach 1 1/2 Mon.	306 μ	" "	=	100,0 %
" 3 "	307 μ	" "	=	100,0 %
" 5 "	286 μ	" "	=	93,5 %
" 6 1/2 "	281 μ	" "	=	92,0 %
" 8 "	281 μ	" "	=	92,0 %
" 1 Jahr.	282 μ	" "	=	92,5 %
" 1 1/2 "	278 μ	" "	=	90,5 %
" 2 "	269 μ	" "	=	88,0 %

Charge 3: Lagerung unter Vakuum bei Zimmertemperatur, dunkel:

sofort	306	†	Ergotamintartrat	=	100,0 %
nach 1 1/2 Mon.	306	†	" "	=	100,0 %
" 3 "	307	†	" "	=	100,0 %
" 5 "	285	†	" "	=	93,0 %
" 6 1/2 "	287	†	" "	=	94,0 %
" 8 "	285	†	" "	=	93,0 %
" 1 Jahr.	287	†	" "	=	94,0 %
" 1 1/2 "	284	†	" "	=	92,8 %
" 2 "	278	†	" "	=	91,0 %

Charge 4: Lagerung unter Stickstoff im Kühlschrank:

sofort	306	†	Ergotamintartrat	=	100,0 %
nach 1 1/2 Mon.	306	†	" "	=	100,0 %
" 3 "	305	†	" "	=	99,5 %
" 5 "	293	†	" "	=	95,5 %
" 6 1/2 "	291	†	" "	=	95,0 %
" 8 "	288	†	" "	=	94,0 %
" 1 Jahr.	291	†	" "	=	95,0 %
" 1 1/2 "	291	†	" "	=	95,0 %
" 2 "	293	†	" "	=	96,0 %

Charge 5: Lagerung unter Stickstoff bei Zimmertemperatur, hell:

sofort	306	†	Ergotamintartrat	=	100,0 %
nach 1 1/2 Mon.	300	†	" "	=	98,0 %
" 3 "	281	†	" "	=	92,0 %
" 5 "	286	†	" "	=	93,5 %
" 6 1/2 "	281	†	" "	=	92,0 %
" 8 "	273	†	" "	=	89,2 %
" 1 Jahr.	280	†	" "	=	91,5 %
" 1 1/2 "	269	†	" "	=	88,0 %
" 2 "	263	†	" "	=	86,0 %

Charge 6: Lagerung unter Stickstoff bei Zimmertemperatur, dunkel:

sofort	306	†	Ergotamintartrat	=	100,0 %
nach 1 1/2 Mon.	299	†	" "	=	97,8 %
" 3 "	288	†	" "	=	94,0 %
" 5 "	286	†	" "	=	93,5 %
" 6 1/2 "	290	†	" "	=	94,7 %
" 8 "	278	†	" "	=	90,9 %
" 1 Jahr.	286	†	" "	=	93,5 %
" 1 1/2 "	276	†	" "	=	90,3 %
" 2 "	277	†	" "	=	90,6 %

Charge 7: Lagerung unter Luft im Kühlschrank:

sofort	306	†	Ergotamintartrat	=	100,0 %
nach 1 1/2 Mon.	305	†	" "	=	99,7 %
" 3 "	305	†	" "	=	99,7 %
" 5 "	283	†	" "	=	92,1 %
" 6 1/2 "	285	†	" "	=	93,0 %
" 8 "	276	†	" "	=	90,3 %
" 1 Jahr.	283	†	" "	=	92,5 %
" 1 1/2 "	283	†	" "	=	92,5 %
" 2 "	281	†	" "	=	92,0 %

Charge 8: Lagerung unter Luft bei Zimmertemperatur, hell:

sofort	306	†	Ergotamintartrat	=	100,0 %
nach 1 1/2 Mon.	298	†	" "	=	97,5 %
" 3 "	285	†	" "	=	93,0 %
" 5 "	268	†	" "	=	87,6 %
" 6 1/2 "	262	†	" "	=	85,6 %
" 8 "	262	†	" "	=	85,6 %
" 1 Jahr.	264	†	" "	=	86,3 %
" 1 1/2 "	254	†	" "	=	83,0 %
" 2 "	252	†	" "	=	82,5 %

Charge 9: Lagerung unter Luft bei Zimmertemperatur, dunkel:

sofort	306	✓	Ergotamintartrat	=	100,0 %
nach 1 1/2 Mon.	299	f	" "	=	97,8 %
" 3 "	293	f	" "	=	95,7 %
" 5 "	271	f	" "	=	88,5 %
" 6 1/2 "	269	f	" "	=	88,0 %
" 8 "	269	f	" "	=	88,0 %
" 1 Jahr.	270	f	" "	=	88,2 %
" 1 1/2 "	260	f	" "	=	85,0 %
" 2 "	257	f	" "	=	84,0 %

Untersuchung von Reinalkaloidtabletten
aus Ergotamintartrat und Ergometrin.

Ergotamintartrat bzw. Ergometrin	0,5 g
Saccharum lactis	100,5 g
Amylum Solani	28,5 g
Alumin.hydric.colloid.	6,0 g
Talcum	10,0 g
Magnes.stearinic.	4,5 g

Die Bereitung und Prüfung der Tabletten erfolgte wie auf Seiten 81/82 beschrieben. Zur quantitativen Alkaloidbestimmung wurde eine Tablette mit 5 ml 20 %iger Weinsäure eine Stunde lang extrahiert. Nach Abfiltrieren vom Ungelösten wurden 2 ml des klaren, farblosen Filtrates mit 4 ml Reagens nach van Urk vermischt und kolorimetrisch ausgetestet. Die Ergebnisse der verschiedenen Prüfungen sind in Tabelle 29 zusammengefaßt.

Tabletten aus	Einzelgewicht	Dosierungs- genauigkeit	Zerfalls- zeit	Alkaloid- gehalt
Ergotamintartrat	0,057 g	± 0,5 %	35 Sek.	197f
Ergometrin	0,061 g	± 0,5 %	39 Sek.	213f

Tabelle 29

Die Lagerung der Tabletten erfolgte im Kühlschrank und bei Zimmertemperatur mit und ohne Lichtschutz. Der Alkaloidgehalt wurde nach der "Weinsäure-Methode" (vgl. Seite 82) nach 3 - 6 und 9 Monaten kolorimetrisch bestimmt. Die "Blauwerte" der jeweils 20 Einzelanalysen zeigt Tabelle 30.

Ergotamin- tartrat Tbl.	Kühlschrank- Temperatur	Zimmertemp. dunkel	Zimmertemp. hell
nach 3 Mon.	194 f = 100,0 %	192 f = 99,0 %	193 f = 99,5 %
nach 6 Mon.	195 f = 100,5 %	195 f = 100,5 %	187 f = 96,5 %
nach 9 Mon.	193 f = 99,5 %	193 f = 99,5 %	185 f = 95,5 %
Ergometrin Tabletten			
nach 3 Mon.	213 f = 101,5 %	210 f = 100,0 %	209 f = 99,5 %
nach 6 Mon.	210 f = 100,0 %	207 f = 98,5 %	206 f = 98,0 %
nach 9 Mon.	208 f = 99,0 %	209 f = 99,5 %	198 f = 94,5 %

Tabelle 30

Die papierchromatographischen Untersuchungen der Tabletten fanden nach 3 Wochen, nach 2 - 3 - 4 1/2 - 6 und 9 Monaten statt. Dazu wurden je 2 Tabletten in einem kleinen Reagensglas mit 1 ml 70 %igem Methanol, dem 1 % Weinsäure zugesetzt war, unter öfterem Umrühren mit einem Glasstab extrahiert. Nach einstündigem Stehen wurde vom Ungelösten abfiltriert und das klare Filtrat papierchromatographisch untersucht.

Prüfung auf Ergometrinin, Spalt- bzw. Verseifungs- und Oxydationsprodukte:

0,05 ml beider Filtrate wurden mit Blutzuckerpipetten auf Rundfilter von 16 cm Ø (Schleicher & Schüll 2045 b) aufgetropft und nach der "Rutter-Technik" in Petrischalen von 15 cm Ø und 2 cm Höhe mit 170 ml Butanol-Eisessig-Wasser-Gemisch (4:1:5)

entwickelt. Nach 4 Stunden wurden die Chromatogramme getrocknet und durch Bestrahlen mit ultravioletttem Licht die Lage der einzelnen Substanzringe sichtbar gemacht.

Prüfung auf Ergotaminin:

0,05 ml der Ergotamin-Filtrate wurden mit Testlösungen von Ergotamin und Ergotaminin zusammen auf "Segmentchromatogramme" von 16 cm Ø (Papier Nr. 63 Macherey & Nagel) aufgetragen und mit 170 ml "Ergotamin-Trennungsgemisch" in Petrischalen von 15 cm Ø und 2 cm Höhe nach der "Rutter-Technik" entwickelt. Innerhalb von 2 Stunden waren die Substanzen genügend weit aufgetrennt, ihre Lage wurde in noch feuchtem Zustand unter der U.V.-Lampe ausgewertet.

Bei den papierchromatographischen Untersuchungen sowohl der Ergometrin- als auch der Ergotamintartrat-Tabletten war selbst nach 9-monatiger Lagerung unter den verschiedenen Bedingungen keine Umlagerung, Spaltung bzw. Verseifung und Oxydation der Alkaloide nachzuweisen.

Die Photographie im ultraviolettten Licht.

In einem kleinen Kästchen von 30 x 20 cm Kantenlänge und 15 cm Höhe lag eine "Hanauer Analysen-Quarzlampe". Das Kästchen wurde oben mit einer geschwärzten Glasplatte bedeckt, auf welcher ein durchsichtiger Kreis von 15 cm Ø ausgespart war. Die U.V.-Lampe kam so zu liegen, daß die gesamte ausgestrahlte Lichtmenge diesen durchsichtigen Kreis der Glasplatte gleichmäßig durchstrahlte. Das zu photographierende Papierchromatogramm wurde auf die Aussparung gelegt und mit einer zweiten, dünnen Glasplatte beschwert. Die Kamera (Zeiss Ikon "CONTINA") wurde über der Apparatur in horizontaler Lage in ein Stativ geschraubt. Dabei betrug die Entfernung Papierchromatogramm - Linsenvorderkante bei Einstellung der Entfernungslinse auf 0,8 m genau 30 cm. Auf die Optik der Kamera war eine Vorsatzlinse für Nahaufnahmen (Proxar A 32, f = 0,5 m) geschraubt und

auf diese noch eine Linsenkombination von zwei U.V.-Filtern gekittet (Zeiss Ikon S 27 Nr. 352 und Biermann & Weber 27 E O 20 U.V.). Die Chromatogramme wurden in der Dunkelkammer mit einem "Perutz-Perpantic" Film (17/10 DIN) bei Blende 3,5 und 4 Sekunden Belichtungszeit aufgenommen.

Lösungsmittel-
front

wasserunlösliche
Alkaloide



Bild 1
wasserunlösliche Mutterkornalkaloide
auf dem "Butanol-Chromatogramm"

Lösungsmittel-
front

Ergometrin

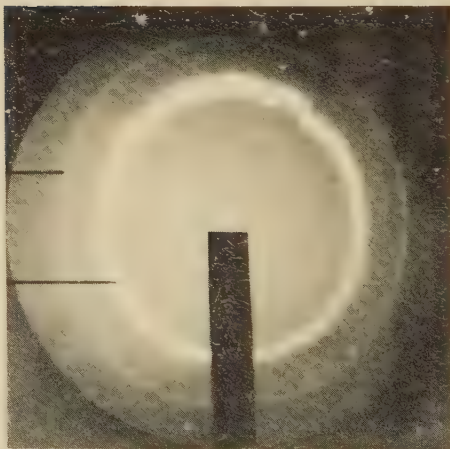


Bild 2
Ergometrin auf dem
"Butanol-Chromatogramm"

Ergotamin-
tartrat

Ergometrin

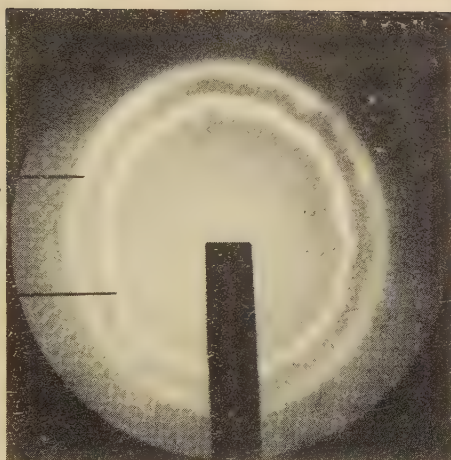


Bild 3
"Neo-Gynergen" auf dem
"Butanol-Chromatogramm"

Lösungsmittel-
front

Ergometrinin

Ergometrin



Bild 4
Ergometrin und Ergometrinin nach
3 monatiger Lagerung in Methanol
auf dem "Butanol-Chromatogramm"

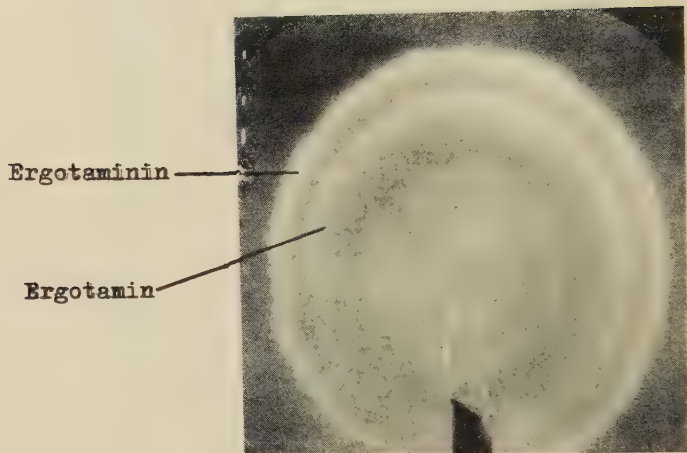


Bild 5
Trennung von Ergotamin und Ergotaminin
mit dem "Ergotamin-Trennungsgemisch"

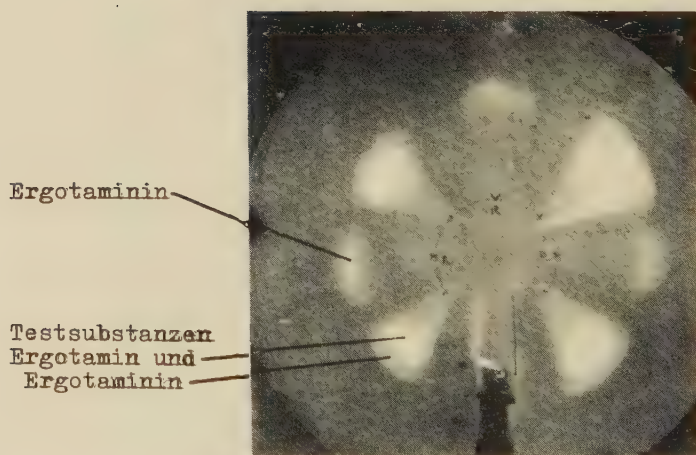


Bild 6
"Segmentchromatogramm" von Ergotaminin
im Vergleich mit Ergotamin und Ergo-
taminin als Testsubstanzen

Lösungsmittel-
front —
Ergotaminin —
Ergotamin —
Agroclavin ? —



Bild 7

Ergotamin und Ergotaminin aus saprophytischer
Kultur neben einem noch nicht identifizierten
Alkaloid (Agroclavin ?)

Lösungsmittel-
front —
Agroclavin ? —

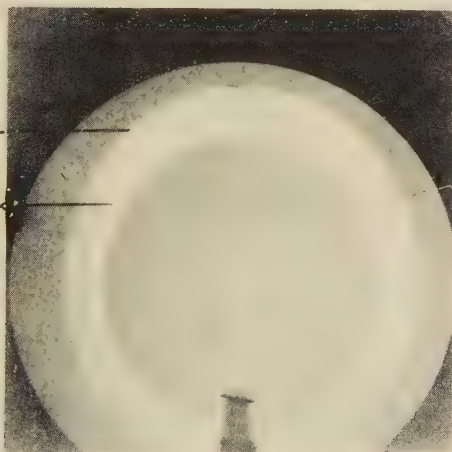


Bild 8

"Butanol-Chromatogramm" des selben Alkaloid-
gemisches. Hier ist der RF-Wert der noch
nicht identifizierten Substanz 0,81.

Lösungsmittel-
front

Abbaupro-
dukte

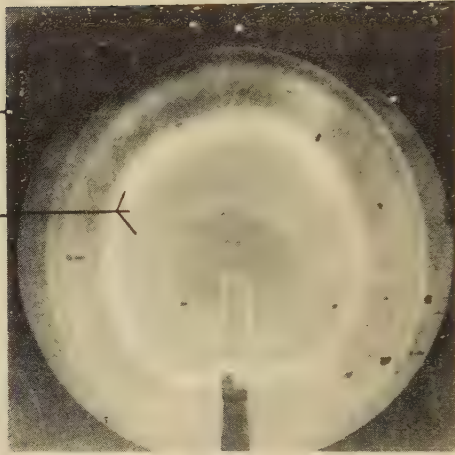


Bild 9

Verseifungsprodukte von Ergotamin
nach 12-tägiger Lagerung in PH 13

Ergotaminin

Ergotamin

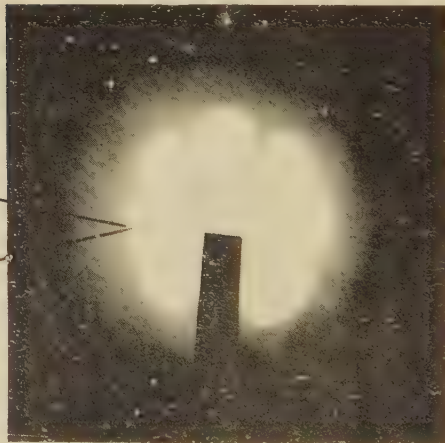


Bild 10

Nachweis von Ergotaminin in
"Gynergen-Tropflösung"

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s .

- (1) A.Stoll, A.Hofmann u. Th.Petrzilka:
Helv.Chim.Acta 34, 1544 (1951)
- (2) M.Abe: Ann.Rep.Takeda Res.Lab. 10, 73 (1951)
- (3) M.Abe et al.: J.Agric.Chem.Soc.Japan 25, 458 (1952)
- (4) A.Stoll et al.: Helv.Chim.Acta 37, 1815 (1954)
- (5) D.M.Wrinch: Nature 137, 411 (1936) u. 138, 241 (1936)
- (6) W.A.Jacobs u. L.C.Craig: Science 82, 16 (1935)
- (7) E.Rothlin: Wiener Klin.Wchschr. 49, 1536 (1936)
- (8) M.Pöhm: Der Dtsch.Apotheker 6, 302 (1954)
- (9) A.Stoll u. F.Troxler: Helv.Chim.Acta 32, 506 (1949)
- (10) A.Stoll, A.Hofmann u. W.Schlientz:
Helv.Chim.Acta 32, 1947 (1949)
- (11) A.Stoll u. A.Hofmann: Helv.Chim.Acta 26, 2070 (1943)
- (12) A.Stoll: Helv.Chim.Acta 28, 1283 (1945)
- (13) E.Rothlin: Klin.Wchschr. 13, 1148 (1934)
- (14) A.Stoll u. A.Hofmann: Helv.Chim.Acta 26, 1570 (1943)
- (15) S.Smith u. G.M.Timmis: J.Chem.Soc.Lond. 1936, 1166
- (16) G.Barger u. A.J.Ewins: J.Chem.Soc. 97, 284 (1910)
- (17) S.Smith u. G.M.Timmis: J.Chem.Soc.Lond. 1937, 396
- (18) A.Stoll, A.Hofmann u. B.Becker:
Helv.Chim.Acta 26, 1602 (1943)
- (19) A.Stoll, A.Hofmann u. Th.Petrzilka: vgl. (1)
- (20) S.Smith u. G.M.Timmis: J.Chem.Soc.Lond. 1932
763, 1433 u. 1543
- (21) S.Smith u. G.M.Timmis: J.Chem.Soc.Lond. 1934, 674
- (22) W.A.Jacobs u. L.C.Craig: J.Biol.Chem. 104, 547 (1934)
- (23) S.Smith u. G.M.Timmis: J.Chem.Soc.Lond. 1936, 1440
- (24) A.Stoll u. A.Hofmann: Helv.Chim.Acta 33, 1705 (1950)
- (25) W.A.Jacobs u. L.C.Craig: J.Biol.Chem.
108, 595 (1934) u. 110, 521 (1935)
- (26) W.A.Jacobs u. L.C.Craig: Science 81, 256 (1935) u.
J.Org.Chem. 1, 245 (1937)
- (27) A.Stoll u. A.Hofmann: Hoppe Seylers 251, 157 (1938)
- (28) A.Stoll u. Th.Petrzilka: Helv.Chim.Acta 36, 1125 (1953)

- (29) A.Stoll, Th.Petrzilka u. J.Rutschmann:
Helv.Chim.Acta 33, 2254 (1950)
- (30) E.Rothlin: vgl. (13)
- (31) H.W.van Urk: Pharm.Weekblad 66, 473 (1929)
- (32) S.A.Schou u. M.Tønnesen: D.T.F. 12, 268 (1938)
- (33) G.E.Foster u. G.A.Stewart:
Quart.J.Pharm.Pharmacol. 21, 211 (1948)
- (34) A.Kofler: Arch.Pharm. 274, 398 (1936)
- (35) A.Kofler: Angew.Chem. 52, 251 (1939)
- (36) G.Kessler: Diss. Mainz 1954
- (37) G.E.Foster, J.Macdonald u. T.S.G.Jones:
J.Pharm.Pharmacol. 1, 802 (1949)
- (38) L.Rutter: Nature 161, 435 (1948)
- (39) O.Lüderitz u. O.Westphal:
Z.Naturforschg. 76, 136 (1952)
- (40) L.Fuchs u. M.Pöhm: Scient.Pharm. 19, 232 (1951)
- (41) J.E.Carless u. H.B.Woodhead: Nature 168, 203 (1951)
- (42) K.Macek: Pharmazie 9, 420 (1954)
- (43) H.Brindle, J.E.Carless u. H.B.Woodhead:
J.Pharm.Pharmacol. 3, 793 (1951)
- (44) V.E.Tyler u. A.E.Schwarting: J.Am.Ass. 41, 354 (1952)
- (45) A.M.Berg: Diss. Utrecht 1953
- (46) K.Macek, A.Cerny u. M.Semonsky:
Pharmazie 9, 388 (1954)
- (47) A.Stoll u. A.Rüegger: Helv.Chim.Acta 37, 1725 (1954)
- (48) W.Offenbacher: Diss. Mainz (in Vorbereitung)
- (49) G.E.Foster et al.: J.Pharm.Pharmacol. 1, 82 (1949)
- (50) K.Heyns u. G.Arends: Hoppe Seylers 287, 8 (1951)

Lebenslauf.

Am 27. November 1926 wurde ich als Sohn des Apothekers Otto Merz und seiner Ehefrau Marta, geb. Steiner, in Stuttgart geboren. Dort besuchte ich die Grundschule und seit 1937 die Friedrich List-Oberschule in Reutlingen, die ich im November 1943 durch die Einberufung zum Wehrdienst verließ. Nach der Rückkehr aus der Kriegsgefangenschaft begann ich im Herbst 1945 meine pharmazeutische Ausbildung in der Hirsch-Apotheke in Reutlingen und legte im Frühjahr 1947 das pharmazeutische Vorexamen ab. Anschließend war ich 3 Semester lang Gasthörer der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Tübingen. Im Herbst 1948 konnte ich das pharmazeutische Studium beginnen, das ich nach 6 Semestern mit der Pharmazeutischen Prüfung abschloß. Nach kurzer praktischer Tätigkeit in der Apotheke setzte ich im Frühjahr 1952 mein naturwissenschaftliches Studium fort und begann am Pharmazeutischen Institut der Johannes Gutenberg-Universität Mainz mit der Bearbeitung des vorliegenden Themas.

